

10/516768

JP03/06641

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

28.05.03

03 DEC 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office

出願年月日
Date of Application:

2002年 6月 4日

REC'D 18 JUL 2003

出願番号
Application Number:

特願 2002-162797

WIPO PCT

[ST.10/C]:

[JP 2002-162797]

出願人
Applicant(s):

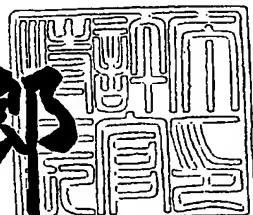
科学技術振興事業団
国立循環器病センター総長

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 7月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2003-3052659

【書類名】 特許願
 【整理番号】 PA909444
 【提出日】 平成14年 6月 4日
 【あて先】 特許庁長官 殿
 【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府寝屋川市大字高宮 652-335
 【氏名】 南野 直人
 【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府茨木市豊川4-26-8-304
 【氏名】 片瀬 剛
 【特許出願人】
 【持分】 050/100
 【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
 【代表者】 沖村 憲樹
 【特許出願人】
 【持分】 050/100
 【識別番号】 591108880
 【氏名又は名称】 国立循環器病センター総長
 【代理人】
 【識別番号】 100102668
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 佐伯 憲生
 【電話番号】 03-5205-2521
 【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 039251
 【納付金額】 10,500円
 【その他】 国等以外の全ての者の持分の割合 50／100

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 cAMPの産生活性を有する新規ペプチド

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の(1)～(6)の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド。

【請求項2】 少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH ₂	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】 ペプチドが少なくとも配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する請求項1又は2に記載のペプチド。

【請求項4】 哺乳動物由来のペプチドである請求項1～3のいずれかに記載のペプチド。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項6】 遺伝子が、配列表の配列番号3、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号17、又は配列番号20で示される塩基配列を有するものである請求項5に記載の遺伝子。

【請求項7】 請求項1～4のいずれかに記載のペプチド、及び製薬上許容される担体とからなる医薬組成物。

【請求項8】 医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤

、利尿剤、食欲抑制剤、又は鎮痛剤である請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】 医薬組成物が、降圧剤、又はPTCA（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤である請求項7に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規かつ有用なペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、次の(1)～(10)の性質、(1)中枢神経系において発現し、(2)カルシトニン受容体に強く作用し、(3)細胞のcAMP産生能を促進させ、(4)ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5)カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6)細胞増殖を抑制する作用を有するペプチド、それをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】

既知ペプチドであるカルシトニンは、32個のアミノ酸からなるポリペプチドホルモンである。哺乳動物では甲状腺のC細胞から分泌され、血液カルシウムを低下させる作用を有する。高カルシウム血症や代謝性骨疾患などの治療薬として利用されている。カルシトニンは、甲状腺など末梢系に存在するとされていて中枢神経系には発現していないとされていた。しかし、カルシトニン受容体は中枢神経系にも存在し、中枢神経系におけるカルシトニン受容体の存在意義や作用についての解明が求められていた。

また、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)はアミノ酸37個からなる蛋白質であり、カルシトニンと同じ遺伝子から転写されたmRNAが、カルシトニンとは異なるスプライシングを受けて生成されるものである。カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、カルシトニンと同様な血液カルシウム濃度を低下させる作用も有するが、カリウムイオンチャンネルの活性化作用やアセチルコリン受容体の数を増加させる作用などもあり、神経伝達物質である可能性もあるとされている。

しかし、これらの蛋白質は中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するものであると確認されておらず、中枢神経系のカルシトニン受容体に直接作用するペプチドの決定が求められていた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用なペプチド、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供することを目的としている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、中枢神経系からcAMP産生を指標にして新規な生理活性ペプチドを探索してきた結果、カルシトニン受容体を介して細胞に作用すると考えられる新規なペプチドを単離、精製した。この構造は、データベース (Genbank, Swissprot, DDBJ) の検索結果から新規配列であることが確認された。本発明者らはこの新規なペプチドがカルシトニン受容体に作用することからカルシトニン受容体刺激ペプチド (Calcitonin Receptor-Stimulating Peptide (CRSP)) と命名した。

【0005】

即ち、本発明は、次の(1)～(6)の性質、

(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より詳細には、本発明は少なくとも次ぎのアミノ酸配列、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH ₂	38

又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配

列を有する前記のペプチドに関する。より具体的には、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。

【0006】

また、本発明のペプチドはカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）と相同意を有するペプチドを含むものであるから、CRSPの有する効果に加えてCGRPに類似した生理活性も期待できる場合がある。即ち、本発明のペプチドは、前記の（1）～（6）の性質に加えて、（7）カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、（8）血管の弛緩作用を有し、（9）利尿を促進させ、（10）血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのCGRPが有する作用と類似した作用を有することも期待される場合もある。

【0007】

また、本発明は前記した本発明のペプチドをコードする塩基配列を有する遺伝子に関する。より詳細には、本発明は、遺伝子が、配列表の配列番号3、配列番号7、配列番号10、配列番号13、配列番号17、若しくは配列番号20で示される塩基配列を有する前記した遺伝子に関する。

さらに、本発明は、前記した本発明のペプチド少なくとも1種、及び製薬上許容される担体からなる医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、医薬組成物が、骨粗鬆症の予防・治療剤、癌の予防・治療剤、利尿剤、食欲抑制剤、鎮痛剤、降圧剤、又はPTCA（経皮的冠動脈形成術）後の再狭窄を防ぐための薬剤である前記した医薬組成物に関する。

【0008】

本発明者らは、ブタ脳抽出液から腎臓上皮細胞のcAMP産生を指標にして2種の新規な生理活性ペプチドを精製した。得られたペプチドのアミノ酸配列を解析したところ、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30

Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH₂ 38

という38個のアミノ酸からなるペプチド（以下、このペプチドをCRSPといふ。）と、そのC末端にさらにグリシンが結合した、

【0009】

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-OH	39

という39個のアミノ酸からなるペプチド（以下、このペプチドをCRSP-G1yといふ。）であることがわかった。

そして、これらのペプチドのアミノ酸配列をデータベース（Genbank, swissprot, DDBJ）で検索したところ、いずれも新規なアミノ酸配列を有するものであることが確認された。

これらのアミノ酸配列を配列表の配列番号1及び2にそれぞれ示す。

【0010】

得られたペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鋳型にPCR法で増幅することにより、目的の遺伝子をクローニングした。

用いたプライマーは、アミノ酸配列を基にN末端側として、

TG(C/T)AA(C/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)TG(C/T)ATGAC、及び、
C末端側として、

CC(A/G)AA(A/C/G/T)AC(C/T)TT(A/G)AA(A/C/G/T)CCCAT

であった。

得られた遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号3に示し、それがコードしているアミノ酸配列を以下に示す。

【0011】

Met-Gly-Phe-Trp-Lys-Phe-Pro-Pro-Phe-Leu-	10
Val-Leu-Ser-Ile-Leu-Val-Leu-Tyr-Gln-Ala-	20
Gly-Met-Phe-His-Thr-Ala-Pro-Met-Arg-Ser-	30

Ala-Phe-Gly-Ser-Pro-Phe-Asp-Pro-Ala-Thr-	40
Leu-Ser-Glu-Glu-Glu-Ser-Arg-Leu-Leu-Leu-	50
Ala-Ala-Met-Val-Asn-Asp-Tyr-Glu-Gln-Met-	60
Lys-Ala-Arg-Glu-Met-Gln-Lys-Gln-Arg-Ala-	70
Gln-Gly-Ser-Gly-Ile-Ser-Val-Gln-Lys-Arg-	80
<u>Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-</u>	90
<u>Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-</u>	100
<u>Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-</u>	110
<u>Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-Gly-Arg-</u>	120
Arg-Arg-Asn-Phe-Trp-Ile	126

(式中、下線を引いた81番目～118番目までがCRSPである。)

このアミノ酸配列を配列表の配列番号4に示す。

【0012】

ブタCRSPをプローブにしてウシ及びイヌ甲状腺cDNAライブラリーから本発明のペプチドを得た。

ウシのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、

ACNTATCMTHRLAGWLRSRG
SMVRSNLLPTKMGFKIFNGP-OH

である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0013】

Ala-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-	10
Arg-Leu-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Ile-Phe-Asn-Gly-Pro-OH	40

【0014】

また、イヌのアミノ酸配列は、アミノ酸の1文字コードで示すと、

SCNSATCVAHWLGGLLSRAG
SVANTNLLPTSMGFKVYN-OH

である。これをアミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0015】

Ser-Cys-Asn-Ser-Ala-Thr-Cys-Val-Ala-His-	10
Trp-Leu-Gly-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ala-Gly-	20
Ser-Val-Ala-Asn-Thr-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-	30
Ser-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Tyr-Asn-OH	38

【0016】

これらのアミノ酸配列、塩基配列、及び遺伝子がコードしている全アミノ酸配列をそれぞれ配列表に示す。

ウシの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号6に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号7に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号8にそれぞれ示す。

また、イヌの本発明のペプチドのアミノ酸配列を配列表の配列番号9に示し、その遺伝子の塩基配列を配列表の配列番号10に示し、その遺伝子に基づくペプチドのアミノ酸配列を配列番号11にそれぞれ示す。

【0017】

ブタCRSPのコード領域全長をプローブとして、ブタ遺伝子ライブラリーよりCRSPと相同性を有するペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをそれぞれ、CRSP-2、CRSP-3と名付けた。

また、同様にして、ブタカルシトニン(CT)と相同性を持つペプチドをコードする遺伝子を得た。この遺伝子の産物であるペプチドをCT-2と名付けた。

CRSP-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる。

【0018】

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His-	10
Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr-	30
Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH ₂	37

【0019】

CRSP-3のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のように

なる。

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His-	10
Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-	20
Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile-	30
Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH ₂	37

【0020】

CT-2のアミノ酸配列は、アミノ酸の3文字コードで示すと次のようになる

Glu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu-	10
Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe-	20
Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Gly-Ile-	30
Arg-Val-Ser-NH ₂	33

【0021】

CRSP-2のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号12に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号13に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号14にそれぞれ示す。また、CRSP-2遺伝子の塩基配列を配列番号15に示す。

CRSP-3のアミノ酸配列を配列表の配列番号16に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号17に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号18にそれぞれ示す。

CT-2のアミノ酸配列を配列表の配列番号19に示し、そのcDNAの塩基配列を配列番号20に、そのcDNAに基づくペプチド（前駆体ペプチド）のアミノ酸配列を配列番号21にそれぞれ示す。また、CRSP-3遺伝子及びCT-2遺伝子の塩基配列を配列番号22に示す。

【0022】

図1に本発明のペプチドの例としてブタCRSPの構造を模式的に示す。この例のペプチドの場合は、2番目のCysと7番目のCysが-S-S-結合している。

また、図2に、本発明のブタCRSP(pCRSP)、ブタカルシトニン遺伝

子関連ペプチド (pCGRP-I) 、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド I (hCGRP-I) 、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチド II (hCGRP-II) 、ヒトアミリン (hAmylin) 、ブタカルシトニン (pCT) 、及びヒトアドレノメデュリン (hAM) のアミノ酸配列を比較したものを示す。

本発明の、CRSPはブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP) と 71.1%、ヒトCGRP-Iと 63.2%、ヒトCGRP-IIと 71.1% とそれぞれアミノ酸配列上の相同性を有している。

また、ブタ由来のペプチドについて、各CRSPとCRGPやAM、CT-2 とCTのアミノ酸の比較を行ったものを図23に示す。

【0023】

次にCRSPの発現部位を調べるためにノーザンブロッティングを行った結果を図3に図面に代わる写真で示す。図3中の矢印は、CRSP mRNAの位置を示している。また、各組織のペプチドの含有量をCRSPの抗体を用いてラジオイムノアッセイにより測定した。この測定結果を次の表1に示す。

【0024】

【表1】

ラジオイムノアッセイで測定したCRSPの組織含量

組織	CRSPの免疫活性 (pmol/g 組織)		
大脳皮質	0.29	±	0.04
小脳	0.18	±	0.02
中脳	7.5	±	0.9
海馬	0.78	±	0.16
尾状核	1.3	±	0.1
視床	3.5	±	0.4
視床下部	9.9	±	1.2
橋・延髄	2.2	±	0.3
脊髄	0.52	±	0.06
嗅球	0.74	±	0.22
下垂体前葉	14	±	2
下垂体後葉	96	±	15
肺	0.11	±	0.00
副腎	0.42	±	0.05
腎臓・皮質	0.12	±	0.01
腎臓・髓質	0.088	±	0.039
肝臓	0.13	±	0.02
脾臓	0.11	±	0.01
胃	0.29	±	0.00
小腸	0.072	±	0.018
睥臓	0.066	±	0.010
甲状腺	68	±	39
卵巢	0.18	±	0.09
心房	0.20	±	0.04
心室	0.21	±	0.09
大動脈	0.33	±	0.19

各数値は平均値 ± 標準誤差 (n=3)を表す

【0025】

この結果、本発明のCRSPは、中枢神経系においては中脳、視床下部に、末梢においては甲状腺に多くの遺伝子発現がみられた。また橋・延髄にも中程度の発現が見られ、大脳、下垂体においても僅かではあるが発現が観察される。一方組織含量は下垂体後葉、甲状腺が最も多く、中脳、視床下部、下垂体前葉にも高

い組織含量が観察された。

【0026】

次に、CRSPの生理活性について検討した。

まず、LLC-PK₁細胞を用いてCRSPのcAMP産生活性を検討した。LLC-PK₁細胞の培地にDMEMに溶解したCRSPを添加して、分泌されてきたcAMPの量をcAMP特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。結果を図4に示す。図4の縦軸はcAMPの産生量 (pmol/10⁵細胞/30分) を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数 (-log (ペプチド濃度(M))) を示す。図4の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pigCGRP)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pigCT)をそれぞれ示す。この結果、本発明のCRSPは、ブタ脣上皮細胞由来のLLC-PK₁細胞の細胞内アデニル酸シクラーゼ活性を濃度依存的に非常に強く(ED₅₀は約1.5nM)上昇させる。この活性はブタカルシトニン(ED₅₀は約8.7nM)より約6倍、ブタCGRP(ED₅₀は約62nM)より約40倍強かった。

【0027】

次に本発明のCRSPのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの促進作用を検討した。

LLC-PK₁細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(²²Na)及びCRSPをそれぞれ終濃度0M、10⁻⁸M、10⁻⁷M、10⁻⁶Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride(EIPA))を終濃度CRSP 0M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁸M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁷M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁶M

+EIPA 10^{-6} M、CRSP 0M+EIPA 10^{-6} Mとなるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる ^{22}Na を完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

結果を図5 (EIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、図6 (EIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み)、及び図7 (カルシウムイオンの取り込み)にそれぞれ示す。図5、図6及び図7の縦軸は各イオンの取り込み量 (c p m) を示し、横軸に左端はコントロール (ペプチド無添加) を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。図6の横軸のコントロールの右はCRSP単独投与の場合を示し、その右はCRSPとEIPAの共投与の各濃度を示し、右端はEIPA単独投与の場合を示す。図7中のsCTは、サケカルシトニンを示す。図5、図6、及び図7中、*印は $p < 0.05$ で、**印は $p < 0.01$ で、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

この結果、CRSPはLLC-PK₁細胞上のアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する。また細胞内へのカルシウムの取り込みを抑制することがわかった。

【0028】

次にCRSPによる細胞増殖の抑制作用について検討した。

LLC-PK₁細胞に各濃度の各ペプチドのDMEM溶液を添加し、 ^{125}I で標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM (0.1% BSAを含む)を各ウエルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。結果を図8に示す。図8の縦軸は ^{125}I -DUの取り込み量 ($\times 100$ c p m/ウエル)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数 (-log (ペプチド濃度(M)))を示す。図8の黒丸 (●) は本発明のCRSPを示し、白丸 (○) はブタカルシトニン (ブタCT) を示し、白菱形 (◇) はサケカルシトニン (サケCT) をそれぞれ示す。

また、細胞の増殖数は、10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞に各濃度のCRSPのDMEM溶液を添加し、培養後、培養皿上の細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。結果を図9に示す。図9の

縦軸は細胞数 ($\times 1,000$ 細胞/ウェル) を示し、横軸は左端はコントロール (C R S P 無添加) を示し、その右は各濃度のC R S P を示す。*印は $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

これらの結果、C R S P は L L C - P K₁ 細胞の増殖を抑制する作用を有することがわかった。

【0029】

次に、本発明のC R S P によるカルシトニン受容体への作用を検討した。

ブタカルシトニン受容体 (C T R) を哺乳類発現ベクター p c D N A 3. 1 に導入し、アカゲザル腎細胞 (C O S - 7) に発現させて C R S P 刺激による c A M P 産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。同様にオポッサム腎細胞 (OK細胞) に C T R を発現させて C R S P 刺激による c A M P 産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム (²²Na) の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。結果を図 1 0 (遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞 (C O S - 7) の C R S P 刺激による c A M P 産生能の変化) 、図 1 1 (ブタカルシトニン受容体 (C T R) を発現させたオポッサム腎上皮細胞の c A M P 産生能の変化) 、及び図 1 2 (ブタカルシトニン受容体 (C T R) を発現させたオポッサム腎上皮細胞のナトリウムイオンの取り込みの変化) に示す。

図 1 0 の縦軸は c A M P の産生量 (p m o l / ウエル / 30 分) を示し、横軸は各ペプチド (リガンド) の濃度の逆対数 (-log (リガンド濃度(M))) を示す。図 1 0 の黒丸 (●) は本発明のC R S P を示し、白菱形 (◇) はブタカルシトニン (p C T) をそれぞれ示す。図 1 1 の縦軸は c A M P の産生量 (f m o l / ウエル / 1 時間) を示し、横軸は C R S P の濃度の逆対数 (-log (C R S P 濃度 (M))) を示す。図 1 1 の黒丸 (●) はブタカルシトニン受容体 (C T R) を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角 (■) はオポッサム腎上皮細胞 (OK細胞) の場合を示す。図 1 2 の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比 (コントロールを 100 とする) を示し、横軸は C R S P の濃度の逆対数 (-log (C R S P 濃度 (M))) を示す。図 1 2 の黒丸 (●) はブタカルシトニン受容体 (C T R) を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、

黒四角 (■) はオポッサム腎上皮細胞 (OK細胞) の場合を示す。図12において、***印は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

この結果、CTRをCOS-7に発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇 (ED₅₀ は約0.2 nM) する。この活性はブタカルシトニン (ED₅₀ は約71 nM) より約350倍強かった。CRSPのこの作用はブタのカルシトニンより約350倍も強力で、既知の生理活性ペプチドの中で最も強いものである。同様にオポッサム腎上皮細胞 (OK細胞) にCTRを発現させてCRSPで刺激すると、細胞内アデニル酸シクラーゼ活性が上昇するのと同時にアミロライド感受性Na/H共輸送体を活性化して細胞内へのナトリウムの取り込みを促進する効果が観察された。

【0030】

さらに、CRSPのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化について検討した。

生理食塩水に溶解した16 nmol/kgに相当する量のCRSPを麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与して、血漿中カルシウム濃度及び血圧を測定した。結果を図13 (CRSP投与による血中カルシウム濃度の変化) 及び図14 (CRSP投与による血圧の変化) に示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度 (mM) を示し、横軸は時間 (分) を示す。図14の縦軸は血圧 (mm Hg) を示し、横軸は時間 (分) を示す。図13中の***印は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

この結果、CRSPの投与により、一過性に血漿中カルシウム濃度が低下するが、一方血圧に対しては明確な変動を及ぼさないことがわかった。

【0031】

続いて、CRSPとCRSP-G1yのcAMP産生促進活性の違いについて検討した。

ブタカルシトニン受容体 (CTR) を哺乳類発現ベクターpCDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞 (COS-7) に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。結果を図15に示す。

この結果、CRSPとCRSP-G1yはほぼ同等のcAMP産活性を有す

ることがわかった。

【0032】

また、ウシ及びイヌから単離してきた本発明のペプチド（ウシCRSP及びイヌCRSP）について、前記したのと同様にしてLLC-PK₁細胞を用いたCRSPのcAMP産生活性を検討した。結果を図16に示す。図16の縦軸はcAMPの産生量（pmol/ウェル/10分）を示し、横軸は添加したCRSPの濃度を示す。

この結果、ウシやイヌのCRSPでもブタCRSPの場合とほぼ同様な結果が得られることがわかった。

【0033】

本発明のペプチドの各種、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量をRT-PCRによる高感度定量により測定した。その結果を図24に示す。

CRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった。CT-2は図24に示された組織以外に限局して発現しているものと考えられる。

【0034】

以上のように、本発明のペプチドは、カルシトニンより強くカルシトニン受容体を刺激し、アデニル酸シクラーゼを活性化することが示された。このことは、本発明のペプチドがカルシトニン受容体の真の内因性のリガンドであることを示している。

従って、本発明のペプチドは、末梢の組織のカルシトニン受容体に作用して以下のよう薬効を奏するものと考えられる。

カルシトニンはその受容体であるカルシトニン受容体を介して骨へのカルシウムの取り込みを促進させる。本発明のペプチドはカルシトニンと同様にカルシトニン受容体に作用して骨へのカルシウムの取り込みを促進させると考えられる。実際に図13で示したようにラットにおいてこのペプチドの投与により、血漿中のカルシウム濃度の減少が観察された。この結果は骨へのカルシウムの取り込み

の促進を裏付けていると考えられる。この作用を利用して骨粗鬆症により低下した骨密度を健常状態に回復させるための薬剤として利用が可能であり、骨粗鬆症の予防・治療剤として使用することができる。

また図13に示されるように、本ペプチドは、血漿中のカルシウム濃度を低下させる活性を持っており、アルカローシス等に伴う高カルシウム血症の血漿中カルシウム濃度を通常レベルにまで下げるための薬剤への応用が可能であり、高カルシウム血症の治療・予防剤として使用することができる。

本ペプチドは、腎上皮細胞のアミロライド感受性Na/H共輸送体の作用を活性化する。これはカリウム保持性の利尿剤であるアミロライドの反対方向の活性であり、抗利尿剤として使用できる。

本発明のペプチドは、図8及び図9で示したようにカルシトニン受容体を介して腎上皮細胞の増殖を強く抑制する。カルシトニンはカルシトニン受容体を介して腺ガン細胞等の増殖を強く抑制する事が報告されている(Cancer Res. 1985, 45, 4890-4894 他)ため、同様に本発明のペプチドもカルシトニン受容体を介してこれらのガン細胞の増殖をカルシトニンよりも強力に抑制すると考えられ、ガンの治療、予防薬として使用できる。

【0035】

本発明のペプチドは、中枢に大量に発現していることが示された。従来から知られてきたアゴニストであるカルシトニンは中枢における発現が認められず、一方カルシトニン受容体は中枢に発現しているため、この事は本発明のペプチドが中枢における真の内因性リガンドであることを示している。カルシトニンを脳室内に投与すると、食欲の抑制、鎮痛作用を示すことが報告されている。カルシトニンは脳内に発現していないため、本ペプチドが脳内でこれらの作用を担っているものと考えられる。

したがって、本発明のペプチドは、中枢神経系のカルシトニン受容体に作用して以下のような薬効を奏するとの考えられる。

カルシトニンは中枢神経系で食欲の抑制に働いていることが報告されている(Science 1979, 206, 850-852, THE BONE 1992, 6, 69-74 他)。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化する事ができる本発明のペプチドは強い食欲

抑制作用を示す可能性が強い。本発明のペプチドの投与により肥満及びそれに伴う疾患（高血圧、高脂血症等）の治療・予防薬として使用することができる。

さらに、従来よりカルシトニン製剤がガンの転移や骨粗鬆症等による骨の痛み、偏頭痛、肺炎による痛み等に対し鎮痛作用を示すことが報告されている（Am. J. Med. Sci. 1997, 313, 13-16 他）。カルシトニン受容体をカルシトニンよりも強く活性化する本発明のペプチドは、カルシトニンと同様に強い鎮痛作用を示す可能性が高く、これらの痛みに対する鎮痛剤として有効性を有する。

【0036】

本発明のペプチドは、（1）中枢神経系において発現し、（2）カルシトニン受容体に強く作用し、（3）細胞のcAMP産生能を促進させ、（4）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（5）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（6）細胞増殖を抑制する作用を有することを特徴とするものである。これらの作用を有するペプチドであれば、前記したアミノ酸配列を有するものに限定されないが、カルシトニンやカルシトニン遺伝子関連ペプチドのアミノ酸配列と50%以上、好ましくは60%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい。前記した例ではブタからの本発明のペプチドであるCRSPを示してきたが、本発明のペプチドはブタ由来のものに限定されるものではなく、ヒト、ラット、イヌ、ウシなどの哺乳動物、サケなどの魚類動物などに由来するペプチドを包含している。

本発明のペプチドは、天然から抽出などの操作により、分離精製することもできる。また、通常のペプチド合成法により合成することもできる。さらに、本発明の遺伝子を適当なベクターに組み込んで、原核細胞や真核細胞を宿主細胞として遺伝子組換え技術により製造することもできる。

【0037】

本発明の医薬組成物は、本発明のペプチドと製薬上許容される担体からなるものである。本発明の医薬組成物は、非経口投与又は経口投与することができ、好ましくは静脈投与、筋肉投与などの非経口投与される。

本発明の医薬組成物は、注射用製剤、凍結乾燥製剤、直腸投与製剤などに製剤化することができる。また、貼付デバイス、軟膏、貼付剤などの外用剤として製

剤化することもできる。さらに、舌下錠として製剤化することもできる。製剤化は通常のペプチド製剤の方法により行うことができる。

本発明の医薬組成物は、有効成分として本発明のペプチドのほかに他の有効成分を組み合わせて使用することもできる。本発明の医薬組成物の投与量としては、有効成分の本発明のペプチドの量として、通常は1日、体重あたり $1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $1000\text{ mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $0.1\text{ mg}/\text{kg}$ ～ $500\text{ mg}/\text{kg}$ の範囲で投与することができるが、患者の性状や疾患の症状に応じて適宜変更することができる。本発明のペプチドは、カルシトニンよりも強くカルシトニン受容体に作用するものであることから、従来のカルシトニン製剤と同様に疾患に適用することもできる。

【0038】

本発明のペプチドはまた、カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）に相同意性を有するペプチドも含まれるため、上記に記載した目的で利用できるのみならず、CGRPに類似した生理活性を利用することが可能である。

CGRPの生理活性としては、CGRP受容体に強く作用し、細胞内のcAMP産生を促進させる作用が知られている。また、CGRPは血管の弛緩作用を緩和すること（Regul Pept. 1986, 15, 1-23等）、利尿を促進させること（Proc Soc Exp Biol Med 1998, 188, 316-322等）、血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞などの細胞の増殖能を変化させること（Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87, 3299-3303; Regul Pept 2001, 101, 169-178等）が報告されている。

【0039】

したがって、本発明のペプチドのなかのある種のもの、特にCGRPとの相同意性の高いペプチドについては、（1）中枢神経系において発現し、（2）カルシトニン受容体に強く作用し、（3）細胞のcAMP産生能を促進させ、（4）ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、（5）カルシウムイオンの取り込みを抑制し、（6）細胞増殖を抑制する作用を有する、ことに加え、（7）カルシトニン関連ペプチド受容体に強く作用し、（8）血管の弛緩作用を有し、（9）利尿を促進させ、（10）血管内皮細胞や血管平滑筋、線維芽細胞の増殖能を変化させる作用などのCGRPが有する作用と類似する作用も合わせ持つ

ものであることが期待されるが、必ずしも本発明のペプチドのすべてが(7)～(10)に示される作用を有するものではない。

このようなCGRPの有する作用に基づけば、本発明のペプチドを含む医薬組成物は、前記した本発明の医薬組成物の使用法の他に次の目的に使用する製剤として利用可能である。すなわち、血管の弛緩作用を直接利用した降圧剤、中枢及び末梢神経系を介した血管弛緩作用を利用した降圧剤、利尿剤、血管平滑筋の増殖の抑制を利用したPTCA(経皮的冠動脈形成術)後の再狭窄を防ぐための薬剤などとしても使用できる可能性がある。

【0040】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【0041】

実施例1 (CRSPペプチドの抽出、単離)

ブタ脳20kgを4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に1Mになるよう酢酸を添加してホモジエナライズし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過(ペリコンカセットPLAC #000-05、ミリポア社)で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度6.6%になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上精をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム(LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5l)に吸着させた。カラムを3倍量の0.5M酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー(水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1)でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。

凍結乾燥標品は秤量後1M酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂(SP-Sephadex、ファルマシア社、3×28cm)の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分(SP-I)、2Mピリジン(pH8.0)で溶出された溶出画分(SP-II)、2Mピリジン-酢酸(pH5.0)で溶出された画分(SP-III)に分画し、SP-III強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後1M酢酸に

溶解し、ゲルfiltration (Sephadex G-50、ファルマシア社、7.5×145 cm、1M酢酸、流速100 ml/h) で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量1 kDa から5 kDa に相当する部分を集めた。これを再びゲルfiltration (Sephadex G-25、ファルマシア社、7.5×145 cm、1M酢酸、流速100 ml/h) で、分子量に応じた画分に分離し、分子量2 kDa から4 kDa に相当する部分を集め、凍結乾燥した。

【0042】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー (CM52、Whatman社、2.4×45cm、A液：10 mMギ酸アンモニウム (pH 6.5) : アセトニトリル=9:1、B液：1Mギ酸アンモニウム (pH 6.5) : アセトニトリル=9:1、流速35 ml/h) を用いて、10 mMから0.5Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM、0.05%牛血清アルブミンを含む) に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞LLC-PK₁を刺激して37°C 1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100 μlに、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサンートリエチルアミン混合液 (ジオキサン:トリエチルアミン=4:1) を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1 mlの緩衝液 (50 mM酢酸ナトリウム (pH 6.2)、1 mM EDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01% Triton X-100) に溶解し、その内100 μlずつを試験管に取り分け、50 μlずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、4°Cで48時間放置した。次に100 μlの1%γ-グロブリン及び500 μlの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

cAMP量の上昇が観察された画分(ギ酸アンモニウム(pH6.5)約0.3M)をさらに陽イオン交換HPLC(TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8×300mm、A液:10mMギ酸アンモニウム(pH3.8):アセトニトリル=9:1、B液:1Mギ酸アンモニウム(pH3.8):アセトニトリル=9:1、流速2ml/min)でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分(ギ酸アンモニウム(pH3.8)約0.36M)を、さらに逆相HPLC(C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6×250mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速1ml/min)でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分(アセトニトリル約32%)を得た。これを再び逆相HPLC(diphenyl 219TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min)にて分離し、(アセトニトリル約29%)最終的な精製標品を得た。

約50pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4099で理論上の等電点は12.81と算出された。また上述の通りVydac社のC₁₈カラム(4.6×250mm、218TP54)で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

【0043】

実施例2 (CRSPのアミノ酸配列の決定)

アミノ酸配列はエドマン法による自動アミノ酸シーケンサーを用いて決定した。まず、5pmolの精製標品をN末端からアミノ酸シーケンサーを用いて解析し、Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-

Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Valを決定した。次に1.0pmolの精製標品をトリプシン分解し、逆相HPLC(C₁₈ 218TP5215、Vydac社、2.1×150mm、A液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=90:

10:1、B液:水:アセトニトリル:10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min)でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行った。得られたピークをアミノ酸シーケンサーで解析し、

Ser-Xaa-Asn-Thr-Ala-Thr-Xaa-Met-Thr-His-Arg、

Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg、

Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg、

Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys、

Met-Gly-Phe-Lys、

Val-Phe

の6個のシーケンスを得ることができた。これらの配列とデータベースとの比較から本ペプチドがカルシトニン遺伝子関連ペプチドと相同性を持ち、このペプチドが

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-NH₂

という配列であると考えられた。

【0044】

一方、質量分析計により分子量を測定したところ、4130.6±0.7Daという結果が得られた。これはアミノ酸配列から予想される4042Daと約89Da異なっていたが、この差異は2個のメチオニンの酸化(16Da×2)とアミノ酸シーケンサーで判読できなかったC末端のグリシン(57Da)の存在によるものではないかと予想された。最終的には次の実施例3よりこれらの予想通りに、

Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Met-Thr-His-Arg-Leu-Val-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Ser-Met-Val-Arg-Ser-Asn-Leu-Leu-Pro-Thr-Lys-Met-Gly-Phe-Lys-Val-Phe-Gly-NH₂

(2番目のCysと7番目のCysの間でジスルフィド結合を形成する。)

であることが明らかになった。

得られたCRSPのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示し、CRSP-G

1~vのアミノ酸配列を配列番号2に示す。

[0045]

実施例3 (相補的DNA塩基配列及び前駆体アミノ酸配列).

プローブは実施例2のアミノ酸配列を基にN末端側

(TG(C/T)AA(C/T)AC(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)AC(A/C/G/T)TG(C/T)ATGAC)

及びC末端側

(CC(A/G)AA(A/C/G/T)AC(C/T)TT(A/G)AA(A/C/G/T)CCCATA)

で合成プライマーを作成し、ブタ遺伝子を鋳型にPCR法で増幅することにより作成した。

相補的DNA λ ファージライブラリーはブタ視床下部mRNA (3 μ g) よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社の λ ZAP IIを用いて作成した。スクリーニングの方法は大腸菌を λ ファージ (約10万個の独立したクローンを持つ) に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37°Cで8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したplaquesをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5M水酸化ナトリウム + 1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う) 後、フィルターを80°Cで2時間乾燥させた。次に乾燥したフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (50%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム) に37°Cで2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42°Cで16時間ハイブリダイゼーションを行う。フィルターは洗浄液で洗浄 (30mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、3mMクエン酸ナトリウム (pH 7.0)、30mM 塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、65°C 1時間を2回行う) 後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のplaquesと照合し、ブ

ラーカから陽性クローンを単離した。

単離された陽性 λ ファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBluescrip ptに変換し、塩基配列はサンガー法により決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号3に示し、そのアミノ酸配列を配列番号4に示す。

得られたCRSPは、ブタカルシトニン(CT)遺伝子関連ペプチド(CG RP)と71.1%、ヒトCGRP-Iと63.2%、ヒトCGRP-IIと71.1%のアミノ酸配列上の相同性を有していた(図2参照)。

【0046】

実施例4 (発現部位)

遺伝子の発現量のためのRNAの調製は酸性グアニンフェノールクロロホルム抽出法により行った。約1gのブタ組織を5mlの変性液(4Mグアニンチオシアン塩、25mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.1M2-メルカプトエタノール、0.5%サルコシン酸ナトリウム)でホモジエナイスし、1/10量の2M酢酸ナトリウム、等量の水飽和フェノール、1/5量のクロロホルムを加えよく攪拌した後、遠心分離を行った。次に水層を分離してそこに等量の2-プロパノールを加えよく攪拌し-20℃で1時間静置し、再び遠心分離し、沈殿(RNA)を回収した。このRNAのうち30 μ gをホルムアルデヒド-アガロース変性ゲル(1%アガロース、2.2Mホルムアルデヒド、20mM MOPS(pH7)、8mM酢酸ナトリウム、1mM EDTA)を用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルを十分水洗してホルムアルデヒドを除去した後、0.05M水酸化ナトリウムに15分間、0.3Mクエン酸ナトリウム(pH7)+3M塩化ナトリウム溶液で45分間処理した。次にゲルに含まれるRNAをキャピラリプロット法でナイロンフィルターに転写し、RNAを転写したフィルターを80℃で乾燥させた。次にフィルターをAmbion社のULTRAhybハイブリダイゼーション液に37℃2時間浸した後、CRSPを暗号化している部分(cDNA上の346番目-488番目の間の塩基対)を³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション後、

フィルターを洗浄液で洗浄 (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) 、 300 mM 塩化ナトリウム、 0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、 室温 5 分間を 2 回、 1.5 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) 、 15 mM 塩化ナトリウム 、 0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、 65°C 1 時間を 2 回行う) 後、 X 線フィルムに感光させ、 RNA の定量を行った。

結果を図 3 に示す。

【0047】

実施例 5 (発現量の測定)

各組織のペプチド含量は合成ペプチドに対して作成した抗体を利用してラジオイムノアッセイにより測定した。組織約 1 g を 10 倍量の水で煮沸し、 氷冷後酢酸を 1M になるよう加え、 ホモジエナイス後、 遠心分離により不溶物を除去して抽出液を作成した。この抽出液を凍結乾燥後、 緩衝液 (50 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) 80 mM 塩化ナトリウム、 25 mM EDTA 、 0.5% Triton X-100, 0.5% 牛血清アルブミン 0.05% アジ化ナトリウム) に溶解し、 100 μl ずつ試験管に取り分けた。これらの CRSP を含む緩衝液及び既知濃度の CRSP を溶解した緩衝液に等量の放射性標識した CRSP 及び抗体を加えて攪拌し、 48 時間 4°C で静置した後、 100 μl の γ -glove 及び 500 μl の 23% ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、 遠心後、 沈殿の放射活性を既知濃度の CRSP により作成した標準曲線の放射活性と比較することで CRSP 量を定量した。

結果を表 1 に示す。表 1 は段落番号 24 に記載したものである。

【0048】

実施例 6 (LLC-PK₁ 細胞における CRSP の cAMP 產生促進作用)

LLC-PK₁ 細胞を栄養培地 (10% 牛胎児血清を含むダルベッコ改変イグル培地 (DMEM)) 中で培養し、 2 日後、 0.05% 牛血清アルブミンを含む DMEM に溶解した CRSP を細胞の栄養培地と置き換えて 30 分間インキュベーション後、 培地を回収して、 分泌されてきた cAMP の量を cAMP 特異的な抗体を用いたラジオイムノアッセイにより定量した。

結果を図 4 に示す。

【0049】

実施例7 (LLC-PK₁細胞におけるCRSP存在下でのナトリウムイオン、カルシウムイオンの取り込みの作用)

LLC-PK₁細胞を6ウェル培養皿上、DMEM(10%FCSを含む)中で2日間培養した。ナトリウムイオンの取り込みの測定は以下のように行った。

LLC-PK₁細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性をもつ塩化ナトリウム(²²Na)及びCRSPをそれぞれ終濃度0M、10⁻⁸M、10⁻⁷M、10⁻⁶Mになるように添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。また同様にLLC-PK₁細胞の培養液をハンクスー塩化コリン液に置換し、一定量の放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)及びそれぞれCRSPとNa/H共輸送体阻害剤であるアミロライド誘導体5-(N-エチル-N-イソプロピル)-アミロライド(5-(N-ethyl-N-isopropyl)-amiloride(EIPA))を終濃度CRSP 0M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 0M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁸M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁷M、CRSP 10⁻⁶M+EIPA 10⁻⁶M、CRSP 0M+EIPA 10⁻⁶Mとなるよう添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる²²Naを完全に除去し、細胞内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定した。

EIPAの非存在下における結果を図5に、またEIPA存在下における結果を図6にそれぞれ示す。

【0050】

カルシウムイオンの取り込みは以下のように行った。LLC-PK₁細胞は塩化カルシウム濃度を0mMに下げたハンクス液(カルシウムフリーハンクス液)で洗浄した。CRSPと共に塩化カルシウム(⁴⁵Ca)を細胞上のカルシウムフリーハンクス液に添加し、10分後、細胞を洗浄して細胞外液に含まれる⁴⁵Caを完全に洗浄し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

結果を図7に示す。

【0051】

実施例8 (CRSPによる細胞増殖の抑制)

LLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレート上、DMEM(10%FCSを含む)中で2日間培養し、細胞をDMEMで一度洗った後、0, 10⁻¹ 2~10⁻⁶MのCRSPを含むDMEM(10%FCSを含む)に置換し培養した。2時間後、¹²⁵Iで標識したプロモデオキシウリジンを含むDMEM(0.1%BSAを含む)を各ウエルに添加して、5時間後核内に取り込まれた放射活性をガンマカウンターにより測定し、細胞増殖に伴って合成されたDNA量を測定した。

結果を図8に示す。

同様に10,000細胞/ウェルのLLC-PK₁細胞を24ウェルコラーゲンプレートに播き、DMEM(10%FCSを含む)で24時間培養した。各ウエルをDMEMで一度洗った後、0M、10⁻⁸M、10⁻⁶Mの濃度のCRSPを含むDMEM(10%FCSを含む)に培地を置換し培養した。24時間後、培養皿上の細胞をトリプシン-EDTA溶液で剥がし、細胞数を計数板にて計測した。

結果を図9に示す。

【0052】

実施例9 (カルシトニン受容体へのCRSPの作用)

ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクター-pcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を図10に示す。

同様にオポッサム腎細胞(OK細胞)にCTRを発現させてCRSP刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイ法により、ナトリウムイオンの取り込みを放射活性を持つ塩化ナトリウム(²²Na)の取り込みをガンマカウンターで計測することにより測定した。

結果を図11及び図12にそれぞれ示す。

【0053】

実施例10 (C R S Pのラットの血圧及び血漿中イオン濃度の変化)

生理食塩水に溶解した 16 nmol/kg に相当する量の C R S P を麻酔条件下でラット頸静脈より短期間に一度に投与した。

結果を図13及び図14に示す。

【0054】

実施例11 (C R S P-G 1 y ペプチドの抽出、単離)

ブタ脳 20 kg を4倍量の水中で10分間煮沸し、冷却後、最終的に 1 M になるよう酢酸を添加してホモジエナイスし、遠心分離で不溶物を除去してブタ脳抽出液を作成した。これを限外濾過（ペリコンカセットPLAC#000-05, ミリポア社）で脱塩し、脱塩後の抽出液に氷冷下、終濃度 6.6% になるようにアセトンをゆっくり加えた。沈殿を遠心分離により除去し、上精をエバポレーターによりアセトンを除去した後、逆相のカラム（LC-SORB SPW-C-ODS、ケムコ、1.5 l）に吸着させた。カラムを3倍量の 0.5 M 酢酸で洗浄した後、3倍量の溶出バッファー（水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸 = $40:60:1$ ）でペプチド画分を溶出した。溶出液はエバポレーターによりアセトニトリルを除去した後、凍結乾燥した。凍結乾燥標品は秤量後 1 M 酢酸に溶解し、陽イオン交換樹脂（SP-Sephadex、ファルマシア社、 $3 \times 28 \text{ cm}$ ）の充填されたオープンカラムに吸着させ、素通り画分（SP-I）、 2 M ピリジン（pH 8.0）で溶出される溶出画分（SP-II）、 2 M ピリジン-酢酸（pH 5.0）で溶出される画分（SP-III）に分画し、SP-III強イオン性画分を得た。この画分を凍結乾燥した後 1 M 酢酸に溶解し、ゲル濾過（SephadexG-50、ファルマシア社、 $7.5 \times 145 \text{ cm}$ 、 1 M 酢酸、流速 100 ml/h ）で分子量に応じてフラクションに分画し、分子量 1 kDa から 5 kDa に相当する部分を集めた。これを再びゲル濾過（SephadexG-25、ファルマシア社、 $7.5 \times 145 \text{ cm}$ 、 1 M 酢酸、流速 100 ml/h ）で、分子量に応じた画分に分離し、分子量 2 kDa から 4 kDa に相当する部分を集め、凍結乾燥した。

【0055】

凍結乾燥標品をイオン交換クロマトグラフィー（CM52、Whatman社、 $2.4 \times 45 \text{ cm}$ 、A液： 10 mM キ酸アンモニウム（pH 6.5）：アセトニトリル = $9:1$ 、

B液：1Mギ酸アンモニウム（pH 6.5）：アセトニトリル=9:1、流速3.5ml/h)を用いて、10mMから0.5Mまでギ酸アンモニウムによる濃度勾配溶出を行った。

ここで各画分の1/1000量を凍結乾燥し、凍結乾燥標品をダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、0.05%牛血清アルブミンを含む）に溶解した培地でブタ腎臓由来の上皮細胞LCL-PK₁を刺激して37℃1時間インキュベーションし、培地に分泌されるcAMP量をラジオイムノアッセイにより定量した。

方法は未知量のcAMPを含む培地及び既知濃度のcAMPを含む培地100μlに、4%になるように無水コハク酸を溶解したジオキサンートリエチルアミン混合液（ジオキサン：トリエチルアミン=4:1）を等量加え、30分間室温で放置してcAMPをサクシニル化し、遠心エバポレーターで乾固した後、1mlの緩衝液（50mM酢酸ナトリウム（pH 6.2）、1mM EDTA、0.025%アジ化ナトリウム、0.5%血清アルブミン、0.01% Triton X-100）に溶解し、その内100μlずつを試験管に取り分け、50μlずつ放射性標識したサクシニル化cAMP及び抗体を加え、4℃で48時間放置した。次に100μlの1%γ-グロブリン及び500μlの25%ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度のcAMPにより作成した標準曲線の放射活性と比較することでcAMP量を定量した。

CRSP-G1yによるcAMP産生の上昇はギ酸アンモニウム（pH 6.5）約0.27Mで溶出される画分に観察された。さらに陽イオン交換HPLC（TSK-gel CM-2SW、東ソー、7.8×300mm、A液：10mMギ酸アンモニウム（pH 3.8）：アセトニトリル=9:1、B液：1Mギ酸アンモニウム（pH 3.8）：アセトニトリル=9:1、流速2ml/min）でギ酸アンモニウムの濃度勾配溶出を行った。再びそれぞれの画分の1/1000量を取り、活性を測定し、活性の観察された画分（ギ酸アンモニウム（pH 3.8）約0.36Mで溶出）を、さらに逆相HPLC（C₁₈ 218TP54、Vydac社、4.6×250mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液：水：アセト

ニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速1ml/min)でアセトニトリルによる濃度勾配溶出を行い、活性を持つ画分（アセトニトリル約32%で溶出）を得た。これを再び逆相HPLC (diphenyl 219TP5215, Vydac社、2.1×150mm、A液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=90:10:1、B液：水：アセトニトリル：10%トリフルオロ酢酸=40:60:1、流速0.2ml/min)にて分離し、（アセトニトリル約29%で溶出）最終的な精製標品を得た。

実際の精製行程において約50pmolのペプチドが得られた。このペプチドの分子量は4157Daで理論上の等電点は11.41と算出された。また上述の通りVydac社のC18カラム (4.6×250mm, 218TP54) で0.1%TFA存在下、アセトニトリル濃度約32%で溶出される程度の疎水性を持っていた。

【0056】

実施例12 (CRSP-G1yのcAMP産生促進作用)

ブタカルシトニン受容体 (CTR) を哺乳類発現ベクターpcDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞 (COS-7) に発現させてCRSP又は、CRSP-G1y刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した。

結果を図15に示す。

【0057】

実施例13 (イヌ・ウシCRSPの遺伝子クローニング)

RNAはイヌ及びウシの甲状腺より、酸性グアニジンフェノールクロロホルム抽出法により抽出した。mRNAの精製は宝酒造Oligotex-dT30 mRNA精製キットを用いて行った。相補的DNAλファージライブラリーはイヌ及びウシの甲状腺mRNA (3μg) よりファルマシア社Time saver cDNA作成キット及びStratagene社 λZAPIIを用いて作成した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をλファージ（約30万個の独立したクローンを持つ）に感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したブラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5M水酸化

ナトリウム + 1. 5M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、0. 5M トリス-塩酸塩 (pH 7. 5) + 1. 5M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、45 mM クエン酸ナトリウム (pH 7. 0) + 450 mM 塩化ナトリウムで 5 分間処理を行う) 後、フィルターを 80°C で 2 時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20% ホルムアミド、0. 09M クエン酸ナトリウム (pH 7. 0)、0. 9M 塩化ナトリウム、0. 5% 牛血清アルブミン、0. 5% フィコール、0. 5% ポリビニルピロリドン、0. 5% ラウリル硫酸ナトリウム) に 37°C で 2 時間浸し、そこに ³²P で標識したプローブを加え、42°C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄 (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7. 0)、300 mM 塩化ナトリウム、0. 1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温 5 分間を 2 回、15 mM クエン酸ナトリウム (pH 7. 0)、150 mM 塩化ナトリウム、0. 1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60°C 1 時間を 2 回行う) 後、X 線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラークと照合し、ブラークから陽性クローニングを単離した。単離された陽性 λ ファージクローニングは Stratagene 社ヘルパーファージ R408 を用いて DNA シーケンスに適したベクターであるプラスミド pBluescript に変換し、塩基配列はサンガーフラッシュ法により決定した。

決定されたウシ CRSP をコードする cDNA の塩基配列を後記配列表の配列番号 7 に示し、そのコードするウシ CRSP の前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号 8 に示す。また、ウシ CRSP のアミノ酸配列を配列番号 6 に示す。

決定されたイヌ CRSP をコードする cDNA の塩基配列を後記配列表の配列番号 10 に示し、そのコードするイヌ CRSP の前駆体ペプチドのアミノ酸配列を配列番号 11 に示す。また、イヌ CRSP のアミノ酸配列を配列番号 9 に示す。

【0058】

実施例 14 (ウシ CRSP 又はイヌ CRSP 刺激による cAMP 産生量の定量)

LLC-PK₁ 細胞を栄養培地 (10% 牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)) 中で培養した。2 日後、細胞を 0. 05% 牛血清アルブミンを含む DMEM で 2 回洗浄し、培養皿中の培地を 0. 5 mM の 3-イソブチ

ル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine) 及び 0.05% 牛血清アルブミンを含む DMEM (DMEM/BSA/IBMX) に置き換えて 37°C で 30 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培地を 0M 及び $10^{-12} \sim 10^{-6}$ M になるよう CRSP を溶解した DMEM/BSA/IBMX に置換し、37°C で 10 分間インキュベーションした。インキュベーション後、培養皿中の培地を除き、そこにエタノールを加え、細胞を破碎するために培養皿を冷凍庫で一回凍結させた。次にエタノールを試験管に移し、遠心エバポレーターを用いて標品を乾固させた。乾固した標品は DMEM に溶解し、100 μl ずつ取り分け、4% になるように無水コハク酸を溶解したジオキサンートリエチルアミン混合液 (ジオキサン : トリエチルアミン = 4 : 1) を等量加え、30 分間室温で放置して cAMP をサクシニル化させた。再び遠心エバポレーターで乾固した後、1 ml の緩衝液 (50 mM 酢酸ナトリウム (pH 6.2)、1 mM EDTA、0.025% アジ化ナトリウム、0.5% 血清アルブミン、0.01% Triton X-100) に溶解し、その内 100 μl ずつを試験管に取り分け、50 μl の放射性標識したサクシニル化 cAMP 及び 50 μl の抗体を加え、4°C で 48 時間放置した。次に 100 μl の 1% ラードブリン及び 500 μl の 25% ポリエチレングリコールを添加してよく混和し、遠心分離を行って沈殿の放射活性をガンマカウンターを用いて測定し、既知濃度の cAMP により作成した標準曲線の放射活性と比較することで cAMP 量を定量した。

結果を図 16 に示す。

【0059】

実施例 15 (CRSP-2 及び CRSP-3/CT-2 前駆体遺伝子のクローニング)

ブタ遺伝子ライブラリーはクローンテック社から購入した。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの前駆体 cDNA 全長約 700 bp を用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ遺伝子が挿入されたスファージ (約 100 万個の独立したクローンを持ち、その内約 30 万個について行った) に感染させて LB 培地を含む 0.7% アガロースと混合し、LB 培地を含む 1.5% 寒天培地を敷いた培養皿に播き、37°C で 8 時間ほど培養した。冷蔵庫で 2 時間ほど冷却

した後、形成したブラークをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性 (0.5 M 水酸化ナトリウム + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、0.5 M トリス-塩酸塩 (pH 7.5) + 1.5 M 塩化ナトリウム溶液で 2 分間、45 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0) + 450 mM 塩化ナトリウムで 5 分間処理を行う) 後、フィルターを 80°C で 2 時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液 (20% ホルムアミド、0.09 M クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.9 M 塩化ナトリウム、0.5% 牛血清アルブミン、0.5% フィコール、0.5% ポリビニルピロリドン、0.5% ラウリル硫酸ナトリウム) に 37°C で 2 時間浸し、そこに ³²P で標識したプローブを加え、42°C で 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄 (30 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、300 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温 5 分間を 2 回、7.5 mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、75 mM 塩化ナトリウム、0.1% ラウリル硫酸ナトリウム溶液、55°C、1 時間を 2 回行った) 後、X 線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のブラークと照合し、ブラークから陽性クローニングを単離した。単離された陽性 λ ファージクローニング法により解析を行って制限酵素地図を作製した後、適当な制限酵素を用いて陽性クローニングを含む DNA を pBlue script にサブクローニングした。塩基配列はサンガー法により決定した。スクリーニングの結果、25 個の陽性クローニングを得ることができた。制限酵素による解析及び塩基配列決定の結果、10 個のクローニングは C R S P の遺伝子をコードしていることが判明した (図 17)。残りの 15 個のクローニングの内、9 個は別の遺伝子を (図 18 及び図 19)、6 個はさらに別の遺伝子をコードしていることが判った。9 個の遺伝子は C R S P と相同性を持つ配列を有していた。この遺伝子を C R S P - 2 と名付けた。また別の 6 個の遺伝子は C R S P と C T に相同性を有する配列を持っていた。これら遺伝子を C R S P - 3 及び C T - 2 と名付けた。図 17 ~ 19 において下線部がエクソンを示す。

C R S P 遺伝子の塩基配列を後記配列表の配列番号 5 に記載する。また、C R S P - 2 遺伝子を配列表の配列番号 15 に記載する。C R S P - 3 遺伝子と C T

- 2遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を配列表の配列番号23に記載する。

【0060】

CRSPやCT/CGRPの遺伝子配列を参考に推定したcDNA配列は図20~22に示す(図20:CRSP-2、図21:CRSP-3、図22:CT-2)。図20~22において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシン、斜体部がシグナルペプチド、図22における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。また各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行ったものが図23である。

CRSP-2のcDNAの塩基配列を後記配列表の配列番号13に、CRSP-3のcDNAを配列番号17に、CT-2のcDNAを配列番号21に記載する。

CRSP-2、CRSP-3とCT-2の成熟体アミノ酸配列は以下であると予想される。

CRSP-2 : Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ser-Cys-Val-Thr-His	10
Lys-Met-Thr-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
· Ser-Val-Ala-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Thr	30
Asn-Val-Asp-Ser-Lys-Ile-Leu-NH ₂	37
CRSP-3 : Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Ile-Cys-Val-Thr-His	10
Lys-Met-Ala-Gly-Trp-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly	20
Ser-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Met-Pro-Ile	30
Asn-Met-Gly-Ser-Lys-Val-Leu-NH ₂	37
CT-2 : pGlu-Cys-Asn-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Val-Leu	10
Gly-Thr-Tyr-Thr-Trp-Asp-Val-Asn-Lys-Phe	20
Tyr-Ala-Phe-Pro-Leu-Thr-Thr-Gly-Ile	30
Arg-Val-Ser-NH ₂	33

CRSP-2のアミノ酸配列を後記配列表の配列番号12に、CRSP-3を配列番号16に、CT-2を配列番号19に記載する。

【0061】

実施例16 (CRSP-2の前駆体cDNAクローニング)

cDNAライブラリーはCRSPのcDNAクローニングを行った時に作成したブタ視床下部cDNAが挿入されたλファージライブラリーを用いた。プローブはブタカルシトニン受容体刺激ペプチドの全長約700bpを用いた。スクリーニングの方法は大腸菌をブタ視床下部cDNAが挿入されたλファージに感染させてLB培地を含む0.7%アガロースと混合し、LB培地を含む1.5%寒天培地を敷いた培養皿に播き、37℃で8時間ほど培養した。冷蔵庫で2時間ほど冷却した後、形成したplaquesをナイロンフィルターに転写し、アルカリ変性(0.5M水酸化ナトリウム+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、0.5Mトリス-塩酸塩(pH7.5)+1.5M塩化ナトリウム溶液で2分間、45mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)+450mM塩化ナトリウムで5分間処理を行う)後、フィルターを80℃で2時間処理した。次にフィルターをプレハイブリダイゼーション液(20%ホルムアミド、0.09Mクエン酸ナトリウム(pH7.0)、0.9M塩化ナトリウム、0.5%牛血清アルブミン、0.5%フィコール、0.5%ポリビニルピロリドン、0.5%ラウリル硫酸ナトリウム)に37℃で2時間浸し、そこに³²Pで標識したプローブを加え、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは洗浄液で洗浄(30mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、300mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、室温5分間を2回、15mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)、150mM塩化ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液、60℃1時間を2回行う)後、X線フィルムに感光させ、放射線により感光する部分を培養皿上のplaquesと照合し、plaquesから陽性クローンを単離した。単離された陽性λファージクローンはStratagene社ヘルパーファージR408を用いてDNAシーケンスに適したベクターであるプラスミドpBluescriptに変換し、塩基配列はサンガーフラッシュ法により決定した。以上の結果、13個の陽性クローンを得ることができた。その内6個は全てCRSP前駆体cDNAのほぼ全長を含むクローンであり、また別の6個は全てCRSP-2前駆体cDNAのほぼ全長を含むクローンであった(図20)。残りの1個はCRSP-3の3'非翻訳領域をコードする短いクローンであった。

【0062】

実施例17 (CRSP-3及びCT-2 cDNAのクローニング)

ブタ視床下部cDNA (mRNAで20ng分) を鑄型にし、プライマー (CRSP-3: GCCCAGCTTACGTCTCCTT及びTCAGGTAAGTCAATGATT、CT-2: AGCAGCTTGATTCTGCCAC及びACCTCCTCTGATATTCCA) 及び宝酒造PyrobestDNAポリメラーゼを用いて、94°C 15秒-55°C 15秒-72°C 1分-30サイクルのPCR法を行った。増幅されたDNAはアガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムプロマイドで染色されたバンドをアガロースゲルから回収した後、Stratagene社pBluescriptIIにサブクローニングし、サンガーフラフターセリクション法により塩基配列を決定した。

CRSP-3のプライマーを用いて増幅されたDNAの塩基配列の解析を行った結果、CRSP-3をコードしている事が判明した(図5)。一方CT-2のプライマーを用いたPCRではDNAの増幅が観察されなかった。

【0063】

実施例18 (RT-PCRによるCRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRP、GAPDHの遺伝子発現量の高感度定量)

ブタの各組織のtotal RNA (4μg) 及びoligo dTプライマー及び東洋紡Revertra Ace逆転写酵素キットを用いて鑄型cDNAを作成し、そのうち1/40をRT-PCRに用いた。各遺伝子cDNAを増幅するためのPCRは東洋紡rTaqポリメラーゼを用いて94°C 15秒-60°C 15秒-72°C 1分-30サイクルで行い、プライマーは以下の配列を用いた。

CRSP: CTCTCTGAGGAGGAATCACG 及び GAGTTAGAGTCATAGTAACC

CRSP-2: CTCACAGAGGAGGAAGTGTC 及び TAGAGTTAGTCAGTTCCCTGGTG

CRSP-3: AGCAGCTTGATTCTGCCAC 及び TGCAGTGAAAGCAACTTGAG

CT-2: AGCAGCTTGATTCTGCCAC 及び ACCTCCTCTGATATTCCA

CT: GCCACTCAGTGAGAAGGAAG 及び TGAGGCATGAGGGATGAAGC

CGRP: GCCACTCAGTGAGAAGGAAG 及び TCACCTTACATGTGTCCCCA

GAPDH: TCACTGCCACCCAGAAGACT 及び AGTGGTCGTTGAGGGCAATG

増幅されたDNAは3%アガロースゲルで電気泳動を行い、フジフィルムFL

A2000を用いて解析した。結果としてCRSP-2及びCRSP-3は中枢及び甲状腺、卵巣に発現が観察された。一方CT-2は何れの組織でもバンドが増幅されず、発現が観察されなかった(図24)。CT-2は図24に示された組織以外に限局して発現しているものと考えられる。

【0064】

【発明の効果】

本発明は、中枢神経に発現し、カルシトニン受容体に強く作用する新規かつ有用なペプチドを提供するものである。本発明のペプチドは、カルシトニン遺伝子関連ペプチドと高い相同意を有し、カルシトニンよりも強い作用を有する。また中枢神経系に多量に発現しており、新規なカルシトニン様ペプチドとして骨粗鬆症や鎮痛剤などとして極めて有用なペプチドである。

【0065】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

National Cardiovascular Center

<120> A New Peptide Having Production Activity of cAMP

<130> PA909444

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 38

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (38)

<223> glycine amide

<220>

<223> CRSP

<400> 1

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Phe Gly

35

<210> 2

<211> 39

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-Gly

<400> 2

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly

35

<210> 3

<211> 679

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP cDNA

<400> 3

 tcaagtgtct ctgccgccttc ttccacagtg ccatgcgcctg acgccaacgc tgctgcctct 60
 gctccctcct ctgctccagt ccacctgggt cctgctgccc gaggggcacc atgggcttct 120
 ggaaatttcc gcccttcctg gttctcagea tcctggctct gtaccaggca ggcatgttcc 180
 acacagcacc aatgagggtct gcctttggga gccctttga tcctgctacc ctctctgagg 240
 aggaatcacg cctccttttg gctgcaatgg tgaatgacta tgagcagatg aaggcccgtg 300

agatgcagaa gcagagggca cagggctccg gcatcagtgt ccagaagaga tcctgcaaca 360
 ctgccacctg catgacccat cggctggtgg gcttgctcag cagatctggg agcatggtga 420
 ggagcaacct gttgcccacc aagatgggct tcaaagtctt tggtgggcgc cgcaggaact 480
 tttggatctg agcagtggga tgattccagg aggaaggta ctatgactct gaactctatt 540
 cgtttaattt acaatgaaag caacctacta aaaaatagca tggaaagacat ccatgtatgc 600
 atgcttctgg aaactgaaaaa cacttttc cttgaaataa actaaaacta aatgcaaaat 660
 aaaatcaatg catcaatgc

679

<210> 4

<211> 126

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP

<400> 4

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Met Arg Ser Ala Phe

20

25

30

Gly Ser Pro Phe Asp Pro Ala Thr Leu Ser Glu Glu Glu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Lys Ala Arg Glu

50

55

60

Met Gln Lys Gln Arg Ala Gln Gly Ser Gly Ile Ser Val Gln Lys Arg

65 70 75 80

Ser Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Val Gly Leu Leu

85 90 95

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

100 105 110

Gly Phe Lys Val Phe Gly Gly Arg Arg Arg Asn Phe Trp Ile

115 120 125

<210> 5

<211> 3796

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene CRSP

<400> 5

ctcgaggatc ctgcctcttg tttcccacaa atcctgcctt cctgtgcttg attccagctg 60
 cctgaatcag acccccctgct tgggcacaga atcatcaacc tgctgcgcatt taacctccca 120
 aaccgcactt ggacatggta gtcttagggg accggggatg ccttgtaatg ctggactctg 180
 ctctacaaag atcacatagc tggggatgga gagggatgtg agcctgcgaa accgaacagg 240
 taaagtttac catgacgtca aactgtcctt aaattcctgc tcactttgcg ttgtttttc 300
 gttggtgccc accaacctcc ccaccccccgc catcaatgac ctcaatgcaa 360

atacaagtgg ggtggtcctg ttggatgctc caggttctgg acgcaagtag tgacacaatc 420
 ctggggctca ggatcttcc ttcattggt tgcctggagc tctgggacca ccccaagattc 480
 agagcggcgg gaataagagc agctgctggt gcgggaaagg gtttagaggca ctacccaccc 540
 caagtgtctc tgccgcttct tccacagtgc catgcctga cgccaaacgct gctgcctctg 600
 ctccctcctc tgctccagtc caccgtgtc ctgctgcccgg gtaagcccg agattcctgc 660
 taagctgtgg ttctgtttct ctctccctct cctcccttcc ctctctctcc attggatttt 720
 cttagctgat ctctttccc gtctcaaagt tcctgtccac ttctctctgg gtctcttcat 780
 cctgtaatat gccttactgc gcaattcatt ctaggctct ttcacaggta actctggatg 840
 gtctcagttc ggggattccc tgctctactc ttccctgagct gagctggct ccagtcttgt 900
 ccccgccagca gacgtgccta ggtccgtgtt gggattttgg agctctccag gcacttcagg 960
 gagaggagga tgcaggaata gctttgagca gaagaaactt tcatggatcc catctcctct 1020
 tacctacaag gatcgctgga aatgggtcg ggacctggga cagtgc当地 gggtggcaaa 1080
 taggtgcaat gactgagggg aaagtagcta ttaaacgcaa gccccagttg aaggttctgg 1140
 gaactcccccc tcccgcacccg ccacccatt taatcttggg tcccaattta aggctgtacc 1200
 agcttggttc ttacaggggtg ctcttgcca gagatggag cagctggaca gtaaaattt 1260
 gttcttcagt ttctcagggta ttccaaactgc agagatatgt cctcccaact cccctcccc 1320
 ccagccaggt ataagcaaaa atcaggcatc aggagagatg ctgatgggtt gcactatggg 1380
 aaaagctgtg gtgacaggta ctgcgagttc gtcctccagg agtcccggcc aacaggttga 1440
 aggtgagagt gtgggtgtgc tggcagggg gctatggacg gagacccctt caccctgtt 1500
 tcctgctagg cttcttgct aaaccaaaca tggcaggc tcactggatc ttccagcagt 1560
 ccacccggct gaggaggaaa tggatggtaa aggaaaggac acgagcagcc tgaagccagg 1620
 aagccaggga gttggaggca gaggcaggag cagagccag gtctgtggc tcaatgaact 1680
 tggaaactgct acaggtggtg acattgttct tcccttgcag aggggcacca tgggcttctg 1740
 gaaatttccg cccttcctgg ttctcagcat cctggcctg taccaggcag gcatgttcca 1800
 cacagcacca atgaggtaag acagccctgc caacaagcac actcacttga tgagaatgt 1860
 atataaacgt gtatataat ttattataag gtggctctgt agaacaatgg atagtgcctt 1920
 gcgctcctat aagtttatca taagctttat gtgtacacaa agtttgtaaa tagacataag 1980
 atatacagta ctcattgtt taaattttat ataacttacaa aaacccacca gcatgtttt 2040
 ttgtttcat caaatatttacccatgtt acacgttat gctcatattt ccataattt 2100

agaaatggat tgtatccaat ttgccaata ctttgctagt aaatttgtta ttaaatctga 2160
 tatggatct acacatctca ttttcacct tcattcaaac tgcattaagc taaaattatt 2220
 ttcccattca aactatcaga aaccaggcaa cctggctgtt tattcctgggg agggcaggc 2280
 aggagatcag aacctgttt taggcttgct tcccctcctt aggtctgcct ttgggagccc 2340
 tttgatcct gctaccctct ctgaggagga atcacgcctc ctttggctg caatggtaa 2400
 tgactatgag cagatgaagg cccgtgagat gcagaagcag agggcacagg gctccggta 2460
 aggttccctg cccaaggaca acagggcata ctttcttcc tctggtcagg cccaggaagg 2520
 catatttaa agtcacttt gagtttctg acccccctgg acatgtctgt gggatgatta 2580
 tggcatttcc cctgacggcc taggatttc tgctgtgatg acctttcta gcagaaatac 2640
 tcaaggttca ctggcctct caaggcagta gtctccatg acgattctgt cgtacagcac 2700
 ctgcactcaa cctctcactg acgggcctt tctttctta tcccacaaat cagcatcagt 2760
 gtccagaaga gatcctgcaa cactgccacc tgcatgaccc atcggctggt gggcttgctc 2820
 agcagatctg ggagcatggt gaggagcaac ctgttgccca ccaagatggg cttcaaagtc 2880
 tttggtgggc gccgcaggaa ctttggatc tgagcagtgg gatgattcca ggaggaaggt 2940
 gactgccctt tttgtacctt cgggtgggag gacagaggac tgggtattgc aggggtgcat 3000
 tccacaccct aaccctctgt gagcgcattgg gggtaaaacc tccacatggc aagggtggca 3060
 caccagtgtc tggagaaagg actgataatc cctataactg aaacattggg ctcttctct 3120
 ctgtttctcc agtctctccc tgtgacactg acatcatctg ccagggaaata tagaccctgt 3180
 ttacttaaaa cactgttccc tgggtattaa ttggggtcca gctctagcat tagaatttga 3240
 aaggtaatga ccctaccctt ttggagcata ctttacaatg ttatgaactt ggagcataga 3300
 ctcggattca aatactgtgt ctgtttcca ctaactgtga ccataggcaa gtatgcctct 3360
 gagcctcagc ttctccttgt aacttgaagg caacaatagt atcctcaata taaaaattaa 3420
 ttagtataac atatgacaag agcctgttaa ctaagaatta ataacattct gttactttt 3480
 tccctccttag gttactatga ctctgaactc tacttcgttt aatttacaat gaaagcaacc 3540
 tactaaaaaa tagcatggaa gacatccatg tatgcatgct tctggaaact gaaaacactc 3600
 ttttccttga aataaactaa aactaaatgc aaaataaaat caatgcatca atgcagttac 3660
 cttgtgtca tctttgtgt atatgattct ataatatgat gcatgtctca ttaggtttaa 3720
 tggttagcaaa tctggccctt gtcagccaaac ctgttggtgg gggcagctct gctaaacctc 3780
 agggtcacat gaattc

3796

<210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> Bos sp.

<220>

<223> BosCRSP

<400> 6

Ala Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met

20

25

30

Gly Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro

35

40

<210> 7

<211> 649

<212> DNA

<213> Bos sp.

<220>

<223> BosCRSP cDNA

<400> 7

tgtctctgcc acttctgcc aactgccact gcctgctgcc aaagctactg ctgctgctcc 60
 ttcctctgct cccagccacc tgggccggc tgtcagagag gtgtcatggg cttctggaag 120
 ttcccccat tcttggtcct cagcatcctg gtcttgcacc aggcaggcat gtttcatgca 180
 gcaccattca ggtctgtctt tggatggcgt tttgatcctg ctaccctgga tgaggagggaa 240
 tcgcgcctcc tactggctgc gatggtgaat gactacgagc agatgagggc ccggagatcg 300
 gagaaggctc agaagaccga gggctcccgc atccagaaga gagcctgcaa cactgccacc 360
 tgcacatgaccc atgcctggc aggctggctg agcagatctg ggagtatggt gaggagcaac 420
 ttgctgccga ccaagatggg ttcaagatc ttcaatggc cccgcaggaa ctccctggttt 480
 taaacagtga aatgacgctg ggaataaggt caccaggaag ctgaactcta cttttagttt 540
 gcatgaaggc accttacaaa aaaagaaaat agcatggaag atacccatgt atgcacatgctt 600
 ctcgatattt gaaataactt aatgcaga 649

<210> 8

<211> 125

<212> PRT

<213> Bos sp.

<220>

<223> precursor peptide of BosCRSP

<400> 8

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Ala Ala Pro Phe Arg Ser Val Phe

20

25

30

Asp Gly Arg Phe Asp Pro Ala Thr Leu Asp Glu Glu Glu Ser Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Met Val Asn Asp Tyr Glu Gln Met Arg Ala Arg Glu

50

55

60

Ser Glu Lys Ala Gln Lys Thr Glu Gly Ser Arg Ile Gln Lys Arg Ala

65

70

75

80

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Met Thr His Arg Leu Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Met Val Arg Ser Asn Leu Leu Pro Thr Lys Met Gly

100

105

110

Phe Lys Ile Phe Asn Gly Pro Arg Arg Asn Ser Trp Phe

115

120

125

<210> 9

<211> 38

<212> PRT

<213> Canis sp.

<220>

<223> CanisCRSP

<400> 9

Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu Leu

1

5

10

15

Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser Met

20

25

30

Gly Phe Lys Val Tyr Asn

35

<210> 10

<211> 686

<212> DNA

<213> Canis sp.

<220>

<223> CanisCRSP cDNA

<400> 10

tctgccacat ccacggtgcc atgcctgac atcggacgcc aacactgcc aagctgccgc 60
 cgcctgtgct ccgagccacc ggctgcctgc agacagagaa gcgtcatggg cttctggaag 120
 ttctccctt tcctggttct cggcatcctg gcgctgtacc aggtggcctt cctccaggca 180
 gcaccattca ggtctgctt ggaaaatcct ccagactctg gtgtgcgcaa tgaggaggaa 240
 ttgcgcctcc tcctggctgc agtcatgtaa gactatatgc agatgtaaac tcatgagctg 300
 gagcaggagc aggagactga gggctccagg gttgctgtcc agaagagatc ctgcaactct 360
 gccacctgtg tggcccattt gctggggaggc ttgctgagca gagccggaag tgtggcaaac 420
 accaacttgc tgcccaccag catgggcttc aaggcttaca atcgacgccg caggaaactt 480
 aaggcttaag cagtgacatg accccaggaa gaaggtcacc atgaagtcaa ctctacttct 540
 cttaacttct aatgaaaaca acttatagaa tgcagagcat ggaagacaca tacatatgca 600
 tgcttactat taaaacattt tgcgtttt gaaataaagt aaaactaaat aaagagaata 660

aaatcataaa aaaaaaaaaa aaaaaa

686

<210> 11

<211> 127

<212> PRT

<213> Canis sp.

<220>

<223> precursor peptide of CanisCRSP

<400> 11

Met Gly Phe Trp Lys Phe Ser Pro Phe Leu Val Leu Gly Ile Leu Ala

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Val Gly Phe Leu Gln Ala Ala Pro Phe Arg Ser Ala Leu

20

25

30

Glu Asn Pro Pro Asp Ser Gly Val Arg Asn Glu Glu Glu Leu Arg Leu

35

40

45

Leu Leu Ala Ala Val Met Lys Asp Tyr Met Gln Met Lys Thr His Glu

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Gln Glu Thr Glu Gly Ser Arg Val Ala Val Gln Lys

65

70

75

80

Arg Ser Cys Asn Ser Ala Thr Cys Val Ala His Trp Leu Gly Gly Leu

85

90

95

Leu Ser Arg Ala Gly Ser Val Ala Asn Thr Asn Leu Leu Pro Thr Ser
 100 105 110

Met Gly Phe Lys Val Tyr Asn Arg Arg Arg Glu Leu Lys Ala
 115 120 125

<210> 12

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-2

<400> 12

Ser Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val
 20 25 30

Asp Ser Lys Ile Leu

<210> 13

<211> 690

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-2 cDNA

<400> 13

ctcaagtgtc tctgccgcctt cttccacagt gccatgcctt gacgccaacg ctgctgcctc 60
 tgctccctcc tctgctccag tccacctgggt tcctgctgcc cgaggggcac catggccttc 120
 tggaaatttc cgcccttcctt ggttctcagc atcctggtcc tgtaccaggc aggcatgttc 180
 cacacagcac ccgtgagatt gcccttggag agcagcttg attctgccac tctcacagag 240
 gaggaagtgt cccttctact ggttgcaatg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gtgctggagc aggagtcaga ggacttcagc atcactgccc aggagaaatc ctgcaacact 360
 gctagctgtg tgacccaccaa gatgacaggc tggctgagca gatctggag cgtggctaag 420
 aacaacttca tgcccaccaa tgtggactcc aaaatcttgg gctgacgccc cagagagcct 480
 caggcctgag ctgtgaaatg actccacaaa gaaggtcacc aaggaactga actctatttc 540
 tttaatctg caatgaaagc aatttatttg aaaaatagca tggaaaacac acatatatgc 600
 atgcttcttgc cttgaaatac agcttttagc tttgaaataaa ctaaaactaa atgcagaata 660
 aaatcattgc agctacactga aaaaaaaaaaa 690

<210> 14

<211> 117

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-2

<400> 14

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Val Leu Ser Ile Leu Val
 1 5 10 15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Phe His Thr Ala Pro Val Arg Leu Pro Leu
 20 25 30

Glu Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Val Ser Leu
 35 40 45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val
 50 55 60

Leu Glu Gln Glu Ser Glu Asp Phe Ser Ile Thr Ala Gln Glu Lys Ser
 65 70 75 80

Cys Asn Thr Ala Ser Cys Val Thr His Lys Met Thr Gly Trp Leu Ser
 85 90 95

Arg Ser Gly Ser Val Ala Lys Asn Asn Phe Met Pro Thr Asn Val Asp
 100 105 110

Ser Lys Ile Leu Gly

115

<210> 15

<211> 7673

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene CRSP-2

<400> 15

ggatccacta gttctagata aaatggacaa atacctagaa acagaagacc taccaagatg 60
 gaaggatgaa gaaatagaaa attcaaatac acctatgact aggaaggaga atgaagcatt 120
 aatccaaaat cttccaacaa agaaaagccc tggatacgat ggcctcattt gtgaatagta 180
 ccagacattt aaagaaaacg aataccaatc cttgtcaaac tttccaaaa acctgaagag 240
 aaaggacaca ccctaaccctt ttctatgagg caggccaaca ttactctgat accaaagatg 300
 gagaaagatt ctgcaaggag aaaaccccta cagacaaaat cctttatgac atggatgtgg 360
 aaaccctcaa cagttatgcta gggatttggaa ttcagaagcg tattaaaagg atcctacaac 420
 atgaccaagt gggatgaatt tctggatgc aaggatgatt caaaaatatga aaattgtatca 480
 aagtgttata tcacaataat ggaatgtagg gaaaaacaca cctgatttatt tccactgata 540
 cagaaaaattt ttttagtaaaa ttcaataacctt tttcaggatt aaaaacaaaa actaggtata 600
 gaaggagact gcctcagcac aatacaacta tatatgaaaa accaacacca acaccataat 660
 ccagggtgga aaactgaaag cttttccctt aagatctgga agaaaatgga aaaaaatttt 720
 taagaatttt cagacagatt tgggtctctg gtacactctg agaaaatcatc ttttagaattt 780
 tttttttttt aaaaataagc acaagaattt cattttaaag aagggaaata acatagcattt 840
 cagagtttat caggagggtt aattttttt tccacactag attgtggcta cctgatgcta 900
 attttgaggt ttaaacataa tgaaataaga ttgtacagcc aagtgccagc tagtcatgga 960
 acttttacctt cagttactgtt tagtgcttca gtcctaagaa gtttcaggga gggctgcgtt 1020
 caatacaagt aatcggtact tgctgaaggt cttaaaatttc gagtgcactt ggtaaatcag 1080

ggatgggcgc agaggagact gttctgtaa ctcagactag tgaaccctag aatttagaaa 1140
 gggtaacttt gtgctccaag caaatcctgt tctacctaac taggtccaaa tgctctgcag 1200
 gctgttagtta gagccctctc atagcaggga gactgccttg gtgaatctgc cagaggaaat 1260
 gaatttccat tcacattcat tcaacaaaca ttggcgagt gccacctcat gtgcaaaaca 1320
 tggtgctaag tgctaaagaa aagatgtgt tttgtaaact taccgcagc tcagagccag 1380
 gacttcttgg aaagtccagag gacttgagga aggagttcat ctcagccccct ccctcactgg 1440
 agagactggc ttttcttcc aagtaaagct taaaactgct ggaggctaag ttagcaccct 1500
 ctggggcag accctgattc ctgcctctca tccccagccc ttgtgtgtg ggcgc当地 1560
 atttctgagt gaggaatgaa tggcgtttt gaacaggaaa ggcacaagtgc gagccagg 1620
 gtagaatgct gaggctacaa attaacatag ttacaatattt gtcttctaaa ggagtgcgtt 1680
 cttagccata gtgcagccac cttgcattt atcaaaactg tggctttcc aatgaaaaaa 1740
 gacatccccca gacacacata cttacaaatg atttcagaag attgataggt cgaaatctc 1800
 aggttttggaa ttttatttgc aaaagcggtt tgcgcctgag ttttaaactt tttttttt 1860
 tttttttt ttttatttgc aaaagcggtt tgcgcctgag ttttaaactt tttttttt 1920
 gctaggggtc taataggcgc catagccacc ggcctacgcc agagctactg caacgctgga 1980
 tccgagccgc atctgcaacc tacaccacaa ctcacggcaa tgccggatcg ttaaccact 2040
 gagcaaggcc agggatcgaa cccgcaacccat catggttctt actcagattc gttaaccact 2100
 ggc当地 ggc当地 acctaccaga ctcttaatta agtagcagag tccaatttac 2160
 atgccc当地 acatctgtt ccccgagttt gcaacttgg tcttgaaact aactcctcac 2220
 gggaaagccaa gccc当地 act ctttttttgc tagtagaaac caggattttac ggagcccgag cagtc当地 2280
 gtgc当地 ctttttttgc tagtagaaac caggattttac ggagcccgag cagtc当地 2340
 tcctgaactc ttctcttctt cacccttgcct tcattttttgc gtgc当地 cctctatgaa 2400
 ccaggatccat ctttttttgc gtctcccgat ccgttgc当地 tcctgaggag agcgagatgc 2460
 aaggccatccat ttcccttagcc ccaatattttt attcttttgc gaaggagaaa agttgaataa 2520
 gggatcttgc当地 taaatggat gttccgagtc cagagacac aaaccggcaa gggaaacaga 2580
 tgtggccgc当地 ggc当地 ctttttttgc tagtagaaac caggatccat tcagttgg acctgtggct 2640
 caggatccat ctttttttgc gtc当地 atttccggctc tgc当地 aaccacttac 2700
 ctggggcctc tgctgc当地 caccggccccc cgtatgttgc gcagcgtttg cc当地 2760
 gggatcttgc当地 aggatgttgc gttttatcgc tgtgtgc当地 gacacggatgc tcctgaggag 2820

catccgaact ggattgggtt agatgtggc acagggctgg aatcacaggt cactggaaca 2880
 tcttggcaaa cagcagccgg aagcaagggg cagctggca aatggttctg ggacattgat 2940
 gggcttagat gatgaatggt ggggctggag gtcggcttgg cggcttggga agcatctatg 3000
 ccgtgcacgt ccctgccc aa gcccagtagg gcaccatctt tccccatatg gtggaccgac 3060
 cacccagcgc gactccagac atccgcacag aggtgggat tggcaaatg gatcgacgatc 3120
 gcacagaatc ccctctgcac ttccctggta agctcttctc gatccctccc tgggtggaga 3180
 gcaggtacat ggctactaat gataccactc ttgaagacg ggaatatgat gccccgttcc 3240
 aaaaattaat atattgaggt gctagaagac actagcccga ttagtacttact acctagaaaa 3300
 ggcacagctg gaacaaagtt tccgtgtgac aaagactgtg atccctgcctc ttgtttccca 3360
 caaatccctgc cttcctgtgc ttgattccag ctgcctgaat cagacccctt gcttggcac 3420
 agaatcatca acctgctgac cattaacctc ccaaaccgca ctggacatg gtagtcttag 3480
 gggaccgggg atgccttgta acgtggact ctgctctaca aagatcacat agctgggat 3540
 ggagagggat gtgagcctgc gaaaccgaac aggtaaagtt taccatgacg tcaaactgtc 3600
 cttaaattcc tgctcacttt gcgtgtgtt ttgcgttggtg cccaccaacc tccccacccc 3660
 ctcccacccc cgccatcaat gacctaattt gaaatacaag tgggtggtc ctgttgatg 3720
 ctccaggttc tggacgcaag tagtgacaca atccctgggc tcaggatctt tcctctcatt 3780
 ggtgcctgg agctctgggaa ccacccaga ttcaagacgg cggaaataag agcagctgct 3840
 ggtgcgggaa agggtagag gcactaccca cctcaagtgt ctctgcgcct tcttccacag 3900
 tgccatcgcc tgacgccaac gctgctgcct ctgctccctc ctgtgctcca gtccacctgg 3960
 ttccctgtgc ccggtaagcc cggagattcc tgctaagctg tggttctgtt tctctctccc 4020
 tctccctccct tccctctc tccattggat tttcttagct gatctctttt cccgtctcaa 4080
 agttcctgtc cacttctc tgggtctctt catcctgtaa tatgccttac tgcaattc 4140
 attctaggct ctttcacag gtaactctgg atggctcag ttggggatt ccctgctcta 4200
 ctcttcctga gctgagctgg gctccagtc tgcgttgcgc gcaacgtgc ttaggtccgt 4260
 gttgggattt tggagctc caggacttc agggagagga ggtgcagga atagcttga 4320
 gcagaagaaa ctttcatgga tcccatctcc tcttacctac aaggatcgct ggaaatgggg 4380
 tcgggacctg ggacagtgc aatgggtggc aaataggtgc aatgactgag gggaaagtag 4440
 ctattaaacg caagccccag ttgaagggttc tggaaactcc ccctccgc ca gcccacccc 4500
 attaatctt gggcccaat ttaaggctgt accggcttgt ttcttacagg gtgtctttt 4560

ccagagtatg gacgagctgg acagtaaaat ttgggtcttc agtttcacag ggattccaac 4620
 tgcagagata tgtcctccca actcccttc ccccccagcca ggtataagca aaaatcaggc 4680
 atcaggagag atgctgatgg gttgcactat gggaaaagct gtggtgacag gtactgtgag 4740
 tctgtccctcc aggagtcccg gccaaacaggt tgaaggtgag agtgtgggtg tgctggcag 4800
 ggggctatgg acggagacct tctcacccag ttgtcctgct aggcttctt gctaaaccaa 4860
 gcatgttgca ggctcactgg atcttccagc agtccacttg gctgaggagg aaatgatggt 4920
 gaaagggaaag gacacgagca gcctgaagcc aggaagccag ggagttggag gcagaggcag 4980
 gagcagagcc caggtctgtg ggctcaatga acttgaaact gctacaggtg gtgacattgt 5040
 tcttcccttg cagagggca ccatggcctt ctggaaattt ccgccttcc tgggtctcag 5100
 catcctggtc ctgttaccagg caggcatgtt ccacacagca cccgtgaggt aagacagcac 5160
 tgggtggcagt gctctcgctt cccacggccc ccggaatcat atagttctgt attgtgagtt 5220
 gtgctgtggcgt gaggctggctt cttgggtggc ttctgtgtat aggggggtgtg gggccctaat 5280
 gtatgaatat agtcatgtat ataagtttat tataaatatt ttgtgatcca agataatatc 5340
 acaaagttta caaataaaata gaagatatac agtattcact ataaatttct aaactcaactg 5400
 aaccttacag catgttttg ttgcctttta tggaaatgtt ataaactttag caaacctata 5460
 tagtaatttta gccataattt gagcaatgaa ttgcattcta attaagtaat ttgtcaataa 5520
 atttggatttta aatctgaaa ggtaatctat acaatttctc acccttccaa aaattatatt 5580
 aatatgaaac cattttcata ttcaaaactat catttaattt ttaataatgg ctgtatttaa 5640
 cactaagctc atacaattcc tgaagatcta accatcagct ttcaaaagcc tacatgatgc 5700
 actttcagca gaactacttt gtggacaccc cagagcctaa ctcatggta agcagcattt 5760
 ttggatgaac actagccita tgtcctgacc gttgagaatt tcatcagcct tattctcaga 5820
 ggaagtggca gaaaccagga aatctggctg cttatcctag ggctgtggta ggctcagagc 5880
 gcatgttggg cttgctttcc cttccagat tgccttggc gagcagctt gattctgcca 5940
 ctctcacaga ggaggaagtg tcccttctac tgggtgcaat ggtgaaggat tatgtgcaga 6000
 tgaaggccac tgtgctggag caggagtcag aggacttcag gtcagtctt gcacccctcc 6060
 cagaatatgg cttaccctct ccctagagta ccaggaaggc atatccttaa gaatgagatt 6120
 tgttatagtg ccataaggct tcatgtccag tctcataagc cttggtttat ttttagttt 6180
 ttacacagga gagattgtct attacagttc tgattccag gtccagtaat gcagagccac 6240
 ctttgggttt tctgacaccc ctgaaaatgt ctatgggag tcatgtgca tttccaaa 6300

agccctatgg tttctgttg ggattttgtg ttagcagaa acatttcagg ttcactggc 6360
 cctctcagag ctgtatccc ccaactgatgg tcagtcctgg gggaaatcac ttgcctcaa 6420
 gctgtcattg gcaggccttc tctttgtctc catcctgaaa atcagcatca ctgcccagga 6480
 gaaatcctgc aacactgcta gctgtgtgac ccacaagatg acaggctggc tgagcagatc 6540
 tgggagcgtg gctaagaaca acttcatgcc caccaatgtg gactccaaaa tcttggcgt 6600
 acgcccaga gaggcctcagg cctgagctgt gaaatgactc cacaaagaag gtgactgctc 6660
 tagaacatgg gatagcaggg caaatggctg ggtatttcag ggggtttggc tacactctaa 6720
 ccctccctga gcctgtactg taaaaaaaaa tccataatga agttgctgac cccattatcc 6780
 tcagaaagaa aagagaatcc taatagccaa aaccctata acttagttc atttctat 6840
 tttccagtg tcctccagtg actctgaggt catctgtcag gaaacataga ttctattctt 6900
 tttctttc ttttggcta caccaaggc atgtgaaagt ttttggcca gggattgaat 6960
 ctgaaccata gctgtgacct atgcagtacc tgtggcaaca ctggatcctt aacccaatgt 7020
 accacatcag gaactcctag gtcctattat ttaaaacact gttccctgca gttataattg 7080
 tgattattct agttttgag tttgaaaggt aatgatctta tccagtgagt ttgaagtata 7140
 actacaatgt cacatataatc tgaattcaga gcattgactt ggtttcaaatt gcgtatgtctg 7200
 tcttccacta actataacaac catgggccag accctctctg aacctcagg ctacatgaaa 7260
 cttaaggca acaataatat ttacctgtta tcattaatat aaaaagtaac tgagataatt 7320
 catggtaaga gcctcactat taataagtaa taatattcta gctcttattt tttttctcc 7380
 taggtcacca aggaactgaa ctctattct ttaatctgc aatgaaagca atttatttg 7440
 aaaatagcat ggaaaacaca catatatgca tgcttcttgc ttgaaataca gcttttagct 7500
 tgaaataaac taaaactaaa tgcagaataa aatcattgca gctacctgat atgtatcatt 7560
 ttaatatttg attctgtatt ctataagtat gactcatgtc tcgctggcctt atctggtagc 7620
 aaatctggac cctgtcagcc aacctgttgg tggtggcagc tctgctaaac ctc 7673

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (37)

<223> Leucine amide

<220>

<223> CRSP-3

<400> 16

Ser Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met
 20 25 30

Gly Ser Lys Val Leu

35

<210> 17

<211> 685

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CRSP-3 cDNA

<400> 17

gcccagctta cgtctccctt ctccgccagt gccatcacct gccaccagcg cggttgtgc 60
 ttctccact tgggctccaa gctacctggt tcctgcattcc agaggggcac catgggcttc 120
 tggaaagtcc cccccttcct gatcctcagc atcctggtcc tgtaccaagc aggaatgctc 180
 catgccgcgc cattcaggat ggcttggga agcagcttg attctgccac actcacggaa 240
 gaggaaatgt ccctcctact gtttgcaatg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc atcaccaccc aggagagatc ctgcaacact 360
 gccatctgtg tgacccacaa gatggcaggc tggctgagca gatctggag cgtggtaag 420
 aacaacttca tgcccatcaa catggctcc aaagtcttg gccggcgccg cagacagcct 480
 caggcctgag ctgtgaaatg actctaaaaa gaagttgaac tcaagttgct ttcactgcaa 540
 agttgcttc cctgcaaatt aaaagaacca atttgaaaaa tagcatggaa gacacacata 600
 tatgcatgct tcttgcttga aatacaactt tttgcttcaa acaaactaaa cctaaatgca 660
 gaataaaaatc attgcagttt cctga 685

<210> 18

<211> 125

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CRSP-3

<400> 18

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gin Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Ile Thr Thr Gln Glu Arg Ser

65

70

75

80

Cys Asn Thr Ala Ile Cys Val Thr His Lys Met Ala Gly Trp Leu Ser

85

90

95

Arg Ser Gly Ser Val Val Lys Asn Asn Phe Met Pro Ile Asn Met Gly

100

105

110

Ser Lys Val Leu Gly Arg Arg Arg Gln Pro Gln Ala

115

120

125

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<221> modified amino acid

<222> (33)

<223> Serine amide

<220>

<221> modified amino acid

<222> (1)

<223> pyroglutamic acid

<220>

<223> CT-2

<400> 19

Glu Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

1

5

10

15

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Gly Ile Arg Val

20

25

30

Ser

<210> 20

<211> 802

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> CT-2 cDNA

<400> 20

gcccagctta cgttccttt ctccgcccagt gccatcacct gccaccagcg cggttgttgc 60

ttctccact tgggctccaa gctacacctggt tcctgcattcc agagggcac catggccttc 120
 tggaaagtcc cccccttcct gatcctcagc atcctggtcc tgtaccaagc aggaatgctc 180
 catgccgcgc cattcaggat ggcttggga agcagcttg attctgccac actcacggaa 240
 gagggaaatgt ccctcctact ggttgcattg gtgaaggatt atgtgcagat gaaggccact 300
 gtgctggagc aggagacaga ggacttcagc ctggacagct ccagagctaa gcagtgcata 360
 aatctgagta cctgtgtgct gggAACATAT acatggacg tcaacaagtt ttatgcattc 420
 cccttaacta caactggat tagagtatct ggcaagaaat gggtcaggc cagagtctca 480
 gagaaagtcc attatccctc aaggcagcat accctaaggt gcttaagaag gcccccaccc 540
 ctccctcctt ctagttcctc tcctagaatt tgcatgtgtt cttctctgg tgctctctga 600
 gctgctatca gcagcttcc ttgtggccat ggatgtctgg aatatcagag aggaggtggg 660
 gggtgggggc aggcaggcca gaagaaaatc actcaggaat agattaggag agaatggca 720
 gcccctgtgag tgcctgtgga tttcacagca gagcttctca gtcctgcttc tgaacatgct 780
 tttcactagg gaataaaaat at 802

<210> 21

<211> 162

<212> PRT

<213> Swine

<220>

<223> precursor peptide of CT-2

<400> 21

Met Gly Phe Trp Lys Phe Pro Pro Phe Leu Ile Leu Ser Ile Leu Val

1

5

10

15

Leu Tyr Gln Ala Gly Met Leu His Ala Ala Pro Phe Arg Met Ala Leu

20

25

30

Gly Ser Ser Phe Asp Ser Ala Thr Leu Thr Glu Glu Glu Met Ser Leu

35

40

45

Leu Leu Val Ala Met Val Lys Asp Tyr Val Gln Met Lys Ala Thr Val

50

55

60

Leu Glu Gln Glu Thr Glu Asp Phe Ser Leu Asp Ser Ser Arg Ala Lys

65

70

75

80

Gln Cys Asn Asn Leu Ser Thr Cys Val Leu Gly Thr Tyr Thr Trp Asp

85

90

95

Val Asn Lys Phe Tyr Ala Phe Pro Leu Thr Thr Thr Gly Ile Arg Val

100

105

110

Ser Gly Lys Lys Trp Val Arg Ala Arg Val Ser Glu Lys Val His Tyr

115

120

125

Pro Ser Arg Gln His Thr Leu Arg Cys Leu Arg Arg Pro Pro Pro Leu

130

135

140

Leu Leu Ser Ser Ser Ser Pro Arg Ile Cys Met Cys Ser Ser Leu Val

145

150

155

160

Ala Leu

<210> 22

<211> 7142

<212> DNA

<213> Swine

<220>

<223> gene of CRSP-3 and CT-2

<400> 22

taccgggccc cccctcgagg tcgacggtat cgataagctt gatatcgaaat tcctgcagcc 60
 cggggatcc ttaaccaact gagggaggcc agggattgaa ctgcgcctc atggatacta 120
 gtccggtttgc ttacacctca gcaacggaa ccccccgtt cactttaag agggtttca 180
 tacagatcct cccacctccg ctatcagtga cctcaatgcg aatacaagtgc cggtggttct 240
 gttaaattct ccaggttccg gaagcaagta ccgacataat cctcttgggg ctcaggattt 300
 ttcccctcat tgggtgcctg gagttccagg accaccctgg attcacagca gcggaaataa 360
 gagcagctgc tgggtgcctg aggccattaga agcactgccc agcttacgtc tccttctcc 420
 gccagtgcca tcacctgcca ccagcgcgt tggtgccttcccacttggg ctccaagcta 480
 cctgggtcct gcatccaggt aagtccaaag attctgctta gctgtgattt tattttttct 540
 ctcccctctcc tcccctccat ttctctccca ttactttcc ttgccggctc cagaggctct 600
 atccatttcc ctcggagttc cttcatcact caatcttata cgcgattttat ctggggtcc 660
 tttaacaggt aacactaaac ggtctcagtt ccagacactg agtctggctc cagttttgcg 720
 gtctcctgccc gcatatgtgc ttaggttaat ctcaggaagc tggagcttcc tcaagcaatg 780
 cgggctgagc agaacgcaga atatcttgcgtt gtagaccgtg agctcagggaa aaccctcttgc 840
 tgcctagctg tctgcggaa atagactcat tttggaaatgg attcgaaact tagaccagg 900
 gaagcgggtg gcaaataat gcaaagactg agggcaggg agccattcaa ctgcaagtcc 960
 tagctgccag tttggggagt tttttgggttgc ttttttctc cccagttaa gtcctgtgtc 1020
 ctaatttaag attccaccag cttgtttttt acagggtaact ctttgcctaa gtttgaagca 1080
 gctgagcagt agaattttgt tcttcagttt ctcagtgatt ctaaccacag agatatgtcc 1140
 tcccaatccc cctccctgc cagctatgag caaaagcctg gttcctggaa gacaactctg 1200

ggttgcatta tgtgaaaagc tgtggggct tactccgagt ttgcctcca ggagtcttgg 1260
 ccaagagggt gcaggtgaga gagtgtgtgg tactggggag gggcaatgg actgagacca 1320
 cctcacccag atgttctggt aggttcttt gctaaaccaa gcatgctgca agcgcactgg 1380
 atatttcagc agtgcacttg gctgaggaga aaatgtatggt gaactgaaat gatatgacca 1440
 gcctgaagcc aagaaaccag ggagtttagag gcagaggcag gagcagaatc cagggcttgt 1500
 aggctcatag aacttggAAC tcctacaggt ggtgacatta ttctccctt gcagagggc 1560
 accatgggct tctggaagtt cccccccttc ctgatcctca gcatcctggc cctgtaccaa 1620
 gcaggaatgc tccatgccgc gccattcagg taagccagcc ctgccaggag ccctctcacc 1680
 tccctcaacc cctgaaatct tagagttctg tggtagtgg tactatgctg aatatggctc 1740
 tctgtgggt tgggggtg tgggtcctg atgtacgaat gtaaacttgt atacaagtt 1800
 atcagaaatg ttttaggagg ctatgtatca caaagttac aaataaacaa aatataatgt 1860
 acttggattt tcatataacg cactgaacct cacagcatgc tgctattgct ttttctcaaa 1920
 cattttagc ttagcaaac ctatTTacta atttcaccat actttgagca gtgggttaca 1980
 tcctaatctg ctaattactt taccaataaa ttgttattt aatgtgatatt ggggtccata 2040
 catctaattt ttaccctca ttcaaattat attaagataa atatTTcat attcaaacta 2100
 tcattatcat ttattgtta ataatggctg tatttaacac taagctcata cagttcctga 2160
 aaattaccat cagtttcaa aagcctatatt gatccaccc cagcaaacct cttcttttag 2220
 gtcaccctag agcctaactc gtggtaagc agcattttg catgaatact ggcctcatgt 2280
 cctgtctgtt gagttgggtt ggcacatcc tcagtggaaag tggcagaaat gaggagtagg 2340
 ggttgggta ggctcagcac atgttgggtt tgctccctt ccccaggatg gcttggaa 2400
 gcagctttga ttctgccaca ctcacggaaaggaaatgtc ctcctactg gttgcaatgg 2460
 tgaaggatta tgtgcagatg aaggccactg tgctggagca ggagacagag gacttcaggt 2520
 cagtctctgc acccctccca gaatatggct taccctctcc cctggagttac caggaaggca 2580
 tgccgtgtg catgcacatg cacactcaca cacacaggta ggagagagca cagctagaca 2640
 ggcagcctgg ggcacacactc ttctacaggc tccactaaaa tcataggtca tgtggaaagaa 2700
 ccacagataa aaacattcct ttctgaaagc agtagggaa ggcgtgagat cacctacagt 2760
 ggaaattttg tagcagtact tggagacact cccagcactg gagtttagcc ttgttaaggta 2820
 aagccaggaa atgaatctca tggatctcag gagatTTtag aaatttggtt cttctcggtt 2880
 aacctgcccata tgatattctt tcacacctgc aaggcatctt cattgcacat ttgcaaggta 2940

aagccagagc acttagaaaa gatgagtcag gtagagcagt ttctgaaata ggtctgaggc 3000
 cttagatgt gtagaatctg tggagatgtg catgttctca tggggccaga caccttctc 3060
 cagtcccaac tctctgtgca ctgagttac tggtcataacc agtcctgac cgagctgtac 3120
 ctggcagag gcatgtgctg caccttatac cgctctaaga acctctgtgc agagcataaa 3180
 ggtctgagca gcatgtggaa tgccagaaaa ggtcgtccct ccccaccaca gcccttcccc 3240
 acatcgccct ggctcagtga acctctgcat cctcctaattt gaggatgcat gagccgcct 3300
 cctgcttgcc ccctcctgccc tctgttccag gtcccccctt cctggtctaa cttctgcat 3360
 gactgcctt gggggcagcc ctggtgcatg gtattgtctg gcatgtctt tccctgcagc 3420
 ctggacagct ccagagctaa gcagtgaat aatctgagta cctgtgtgct gggaaacatat 3480
 acatgggacg tcaacaagtt ttatgcattt cccttaacta caactgggat tagagtatct 3540
 ggcaagaaat gggtcagggc cagagtctca gagaaagtcc attatccctc aaggcagcat 3600
 accctaaggt gcttaagaag gcccccaccc ctccctttt ctgttccctc tcctagaatt 3660
 tgcatgtgtt cttctctggt tgctctctga gctgctatca gcagcttcc ttgtggccat 3720
 ggatgtctgg aatatcagag aggaggtggg ggggtggggc aggcaggcca gaagaaaatc 3780
 actcaggaat agattaggag agaatggca gcccctgtgag tgcctgtgga tttcacagca 3840
 gagcttctca gtcctgcttc tgaacatgct ttctactagg gaataaaagt atgttctaa 3900
 aaacacctga gctatagtgg ccatgtcaca tgcttcatgg atacagagac ttgtctgtca 3960
 agtagcctta gtcctggta gctggagtca gggcatggtg ggtggccct ggagcaacct 4020
 caagttgcaa aatcaggagc actaaggaac aaaacaagca cctctggac ttgtatgctac 4080
 aaactcactt cctcttgcag gaagacaggg gaactttccct tttcttaagg agtactcagt 4140
 acctctgaat gggaggcacc ttccagacaa gtccttaaga atggggttgg gtgtgccacc 4200
 aaaatctctc tatgtcttgg ttaaattttt gtttacttgt acagaaaaga ttggctgtta 4260
 aagttctgtg ttcccttggc tttgtccctg agcacattt ggtttctga caccctgtgga 4320
 aatgtctatg gagagtgtatg atggcatttc cccaaaagcc ctatggttt ctgttggat 4380
 tttgttttgcagaaacat ttcaaggttca ctggccctc tcagagctat aatttccac 4440
 ggatggtcag tcctgggggg aagcacctgc cctcaggctc tcactgacag gccttctctt 4500
 tttgtccatc ctgaaaatca gcatcaccac ccaggagaga tcctgcaaca ctgccatctg 4560
 tttgtgacccac aagatggcag gctggctgag cagatctggg agcgtggta agaacaactt 4620
 catgcccattc aacatggcattt cccaaagtctt gggccggcgc cgccagacagc ctcaaggctg 4680

agctgtgaaa tgactctaaa aagaaggtga ctgctctaga acctgggta gcagggcaaa 4740
 tggctggta ttgcagaggt gctggccaca ctctaaccctt ccgtgggcct gtattataaa 4800
 aacatccaca gcaaaaaggc caaccctagt gtccagagaa agaacagggt cccaagagct 4860
 gaaatcccta gaatttggaa tcacitctat tttttcagt ttctccctgattctgaga 4920
 tcatctgcaa ggaaatatacg atcctatgaa tttaaaacac tttccctgc acttacaatt 4980
 gccattttag gttttgagtt ttaaaggtaa tgatcctatc caatgagttt gaagtataatc 5040
 gtacaatgtc acgtacacctt gaattcagag catagacttg gttcaaatg tgatgtctgt 5100
 cctctactaa ctatatgacc atggccagg ccctctgc gtctcagccctt ctacatgtaa 5160
 ttttaaggca aaaacagtat ctaccgtta ttgttaatataaaagtaat tgagataatt 5220
 catggcaaga gcctcaacat taataaataa taatatccta gctcttgaaa ttttttctc 5280
 cttaggtcacc aagaagttga actcaagttg ctttcactgc aaagttgctt tccctgcaaa 5340
 tttaaagaac caatttggaaa aatagcatgg aagacacaca tatatgcattt ctttttgctt 5400
 gaaatacaac ttttgcttggaaa aacaaaacta aacctaaatg cagaataaaaa tcattgcagt 5460
 tacctgatgt gtatctttt aatattttagt tctgtattct gtaagtatga ctcatgtctc 5520
 actggcttattt ctggtagcaa atctggaccc tgcagccaa cctgttgggt gttgcagctc 5580
 tgctaaacctt caggagcaca tgaaatttgc gcccatttgggg tgtctggggta tgacacagaaa 5640
 ttttggcctt cagtgaaacc tttaaagaaa tggtcttgaa attcccatca tagctcagtg 5700
 gaagcaaattt tgaccagcat cgataaggat gcccatttga tccatggcctt tgccatttgg 5760
 gtcaaggata ttttggccat atgagctgtg gtataggtta caggcgcagc tcagatctgg 5820
 cattgctgtg gctgtggat aggccagcag ctgcagctcc gattcaaccg ctggcatttgg 5880
 aacccatcg tgcgtcaggat gcccatttgggg tgggtccatca gtatcctgtt 5940
 ttttgcattt ttttcacttc atcaagccatggaaaatgttattt ttcagtttacac tttaaaggag 6000
 tccctgctgc ttttgcattt gtttccatca taagaacctc agggacctgtt gaacacttgg 6060
 ttgaccaggat tgcgttgcatttggaaaatgttgggg tgggtccatca gtatcctgtt 6120
 ctctcaggat tgcgttgcatttggaaaatgttgggg tgggtccatca gtatcctgtt 6180
 ttcacattctt cagagggcac cctgggttccc agccccagaaa gttatctgtt ctctctctcc 6240
 ttgactcagg tttggccatca tccatccctg ctttcctcc ccaacagctc ctctttacac 6300
 atccatagc ctgcaaaacc ctttagagca atggctcaca gcttggaaagg gtatcgcaga 6360
 ctggcagacc tggaaaggc ttcagatgccatctaatcca actttttactt ctttggaaagg 6420

cagagaagga aaattatgtt gctcagggtc ctgcaataac tttatgagac atccctatat 6480
 ttaagaata ataattgagt gtctgctatc tctttgacac tatttaagct ccaggaatag 6540
 agcaataaac agaacagaca aaacccctg cattcatgga gcttatattc taactggaag 6600
 agactgaggt gatacatgct ctggaattag aaacattcag cactggaagg aatctggat 6660
 gtcataaggg tataaaggct tatttgcata agctattca tggatcaac atccctggca 6720
 tatgctggca atgctggta ccatctgtt actatgactt ccaaggtgac tggacagcca 6780
 gttcattgg tggacagtca attaagtggg atattttcca ttagagaagt catcccctac 6840
 tacctacaga ttatagttt ttcctaagaa gcacatagaa ttatgaccct tctccattc 6900
 attctgttgtt catcacagta acccaacctt agccataaag gtagatcaga ccatgtctcc 6960
 cttaggacag aataactctat tatagactcc ctttcaca aagtaaacat tttaggcatt 7020
 gcagtgtctt ctaatcaac tctacttggt cagagtatat gtattaaat ttacttccaa 7080
 atttggatt ccctgggttgtt taaggatcca ctagttctag agcggccgccc accgcgggtgg 7140
 7142
 ag

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のペプチドのCRSPの構造を模式的に示すものである。

【図2】

図2は、本発明のペプチドのCRSP (pCRSP) のアミノ酸配列と、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP-I) 、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドI (hCGRP-I) 、ヒトカルシトニン遺伝子関連ペプチドII (hCGRP-II) 、ヒトアミリン (hAmylin) 、ブタカルシトニン (pCT) 、及びヒトアドレノメデュリン (hAM) のアミノ酸配列との比較を示すものである。

【図3】

図3は、本発明のペプチドのCRSPの発現部位を調べるためにノーザンプローティングを行った結果を示す図面に代わる写真である。図3中の矢印は、CR

S P の位置を示している。

【図4】

図4は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPのcAMP産生活性を検討した結果を示すものである。図4の縦軸はcAMPの産生量(μ mol/ 10^5 細胞/30分)を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数(- 10^6 g(ペプチド濃度(M))を示す。図4の黒丸(●)は本発明のCRSPを示し、白丸(○)はブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド(pig CGRP)を示し、白菱形(◇)はブタカルシトニン(pig CT)をそれぞれ示す。

【図5】

図5は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA非存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図5の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。***は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

【図6】

図6は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるEIPA存在下でのナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図6の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右は各濃度のCRSPとEIPAを示す。***は $p < 0.001$ で有意差があったことを示す。

【図7】

図7は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのCRSPによるカルシウムイオンの取り込み試験の結果を示すものである。図7の縦軸は各イオンの取り込み量(cpm)を示し、横軸に左端はコントロール(ペプチド無添加)を示し、その右はsCT(サケカルシトニン)及びCRSPを示す。*は $p < 0.05$ で、**は $p < 0.01$ で有意差があったことを示す。

【図8】

図8は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴って合成されたDNA量の測定結果を示す。図8の縦軸は ^{125}I -D

Uの取り込み量 ($\times 100 \text{ cpm}$ / ウエル) を示し、横軸は各ペプチドの濃度の逆対数 (-10^g (ペプチド濃度(M))) を示す。図8の黒丸 (●) は本発明のCRSPを示し、白丸 (○) はブタカルシトニン (ブタCT) を示し、白菱形 (◇) はサケカルシトニン (サケCT) をそれぞれ示す。

【図9】

図9は、LLC-PK₁細胞における本発明のペプチドのCRSPによる細胞増殖に伴う細胞数を計数板にて計測結果を示す。図9の縦軸は細胞数 ($\times 1,000$ 細胞 / ウエル) を示し、横軸は左端はコントロール (CRSP無添加) を示し、その右は各濃度のCRSPを示す。*印は $p < 0.05$ で有意差があったことを示す。

【図10】

図10は、遺伝子工学的にカルシトニン受容体を発現している細胞 (COS-7) における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図10の縦軸はcAMPの産生量 ($\text{pmol}/\text{ウェル}/30\text{分}$) を示し、横軸は各ペプチド (リガンド) の濃度の逆対数 (-10^g (リガンド濃度(M))) を示す。図10の黒丸 (●) は本発明のCRSPを示し、白菱形 (◇) はブタカルシトニン (pCT) をそれぞれ示す。

【図11】

図11は、ブタカルシトニン受容体 (CTR) を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるcAMP産生能測定結果を示す。図11の縦軸はcAMPの産生量 ($\text{fmol}/\text{ウェル}/1\text{時間}$) を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数 (-10^g (CRSP濃度(M))) を示す。図11の黒丸 (●) はブタカルシトニン受容体 (CTR) を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角 (■) はオポッサム腎上皮細胞 (OK細胞) の場合を示す。

【図12】

図12は、ブタカルシトニン受容体 (CTR) を発現させたオポッサム腎上皮細胞における本発明のペプチドのCRSP刺激によるナトリウムイオンの取り込み試験の結果を示す。図12の縦軸はナトリウムイオンの取り込み量の比 (コン

トロールを100とする)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-10g(CRSP濃度(M)))を示す。図12の黒丸(●)はブタカルシトニン受容体(CTR)を導入したオポッサム腎上皮細胞の場合を示し、黒四角(■)はオポッサム腎上皮細胞(OK細胞)の場合を示す。図12中の***印はp<0.001で有意差があったことを示す。

【図13】

図13は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血中カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。図13の縦軸は血中カルシウム濃度(mM)を示し、横軸は時間(分)を示す。図13中の**印はp<0.01で有意差があったことを示す。

【図14】

図14は、ラットにおける本発明のペプチドのCRSP投与による血圧の変化を測定した結果を示す。図14の縦軸は血圧(mmHg)を示し、横軸は時間(分)を示す。

【図15】

図15は、ブタカルシトニン受容体(CTR)を哺乳類発現ベクターpCDNA3.1に導入し、アカゲザル腎細胞(COS-7)に発現させた細胞に対し、CRSP又はCRSP-Gly刺激によるcAMP産生量をラジオイムノアッセイにより測定した結果を示す。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/130分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-10g(CRSP濃度(M)))を示す。

【図16】

図16は、LLC-PK₁細胞を用いた本発明のペプチドのブタCRSP、ウシCRSP及びイヌCRSPのcAMP産生促進活性を検討した結果を示すものである。縦軸はcAMPの産生量(pmol/ウェル/10分)を示し、横軸はCRSPの濃度の逆対数(-10g(CRSP濃度(M)))を示す。図16の(■)はブタCRSPを示し、(●)はウシCRSPを示し、(▲)はイヌCRSPをそれぞれ示す。

【図17】

図17は、CRSP遺伝子の塩基配列を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図18】

図18は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の前半部分（1～3840塩基）を示す。

【図19】

図19は、CRSP-2遺伝子の塩基配列の後半部分（3841～7673塩基）を示す。下線部がエクソンを示す。下線部の下にCRSP-2遺伝子のコードするアミノ酸配列を示す。

【図20】

図20は、CRSP-2のcDNA塩基配列を示す。図20において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

【図21】

図21は、CRSP-3のcDNA塩基配列を示す。図21において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。

【図22】

図22は、CT-2のcDNA塩基配列を示す。図22において、実線で囲まれた部分が成熟ペプチドで、灰色がアミドに変換されると推定されるグリシンを示す。図22における成熟体のN末端側にあるグルタミンはピログルタミン酸に変換されると推定される。

【図23】

図23は、各CRSPとCGRPやAM、CT-2とCTのアミノ酸の比較を行った図を示す。

本発明のペプチドのCRSP (pCRSP) 、CRSP-2 (pCRSP-2)

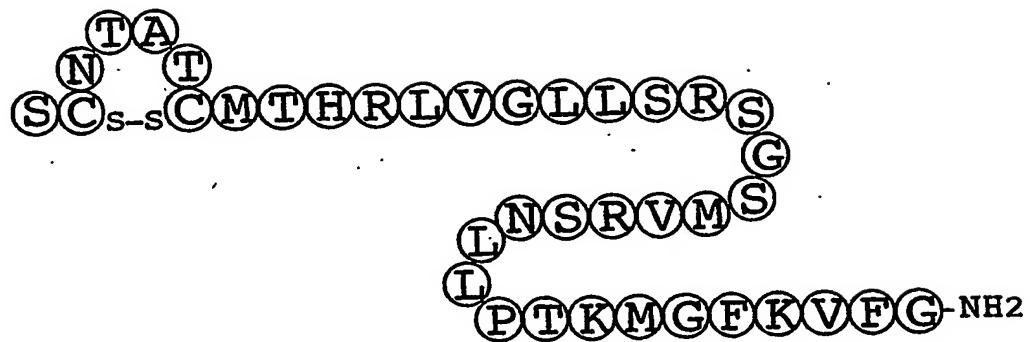
、CRSP-3 (pCRSP-3) 、CT-2 (pCT-2) のアミノ酸配列と
、ブタカルシトニン遺伝子関連ペプチド (pCGRP) 、ブタカルシトニン (p
CT) 、及びブタアドレノメデュリン (pAM) のアミノ酸配列との比較を示す
ものである。

【図24】

図24は、CRSP、CRSP-2、CRSP-3、CT-2、CT、CGRPの遺伝子発現量をRT-PCRにより高感度定量した結果を示す。図の縦軸に各種遺伝子を、横軸に遺伝子発現量を測定したブタの組織を示す。トータルRNA量の補正のためにGAPDH (グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素) の発現量についても測定した。

【書類名】 図面

【図1】

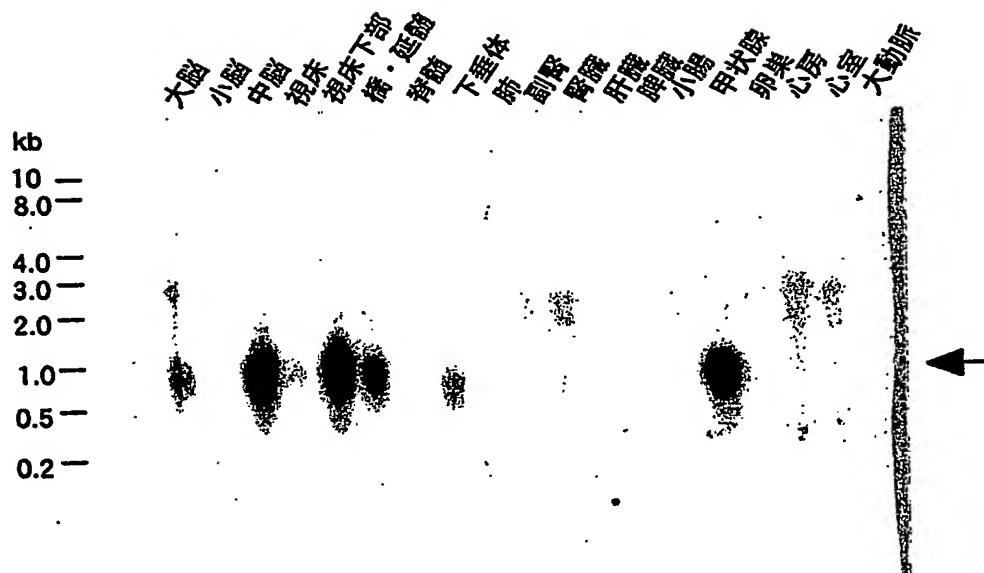


【図2】

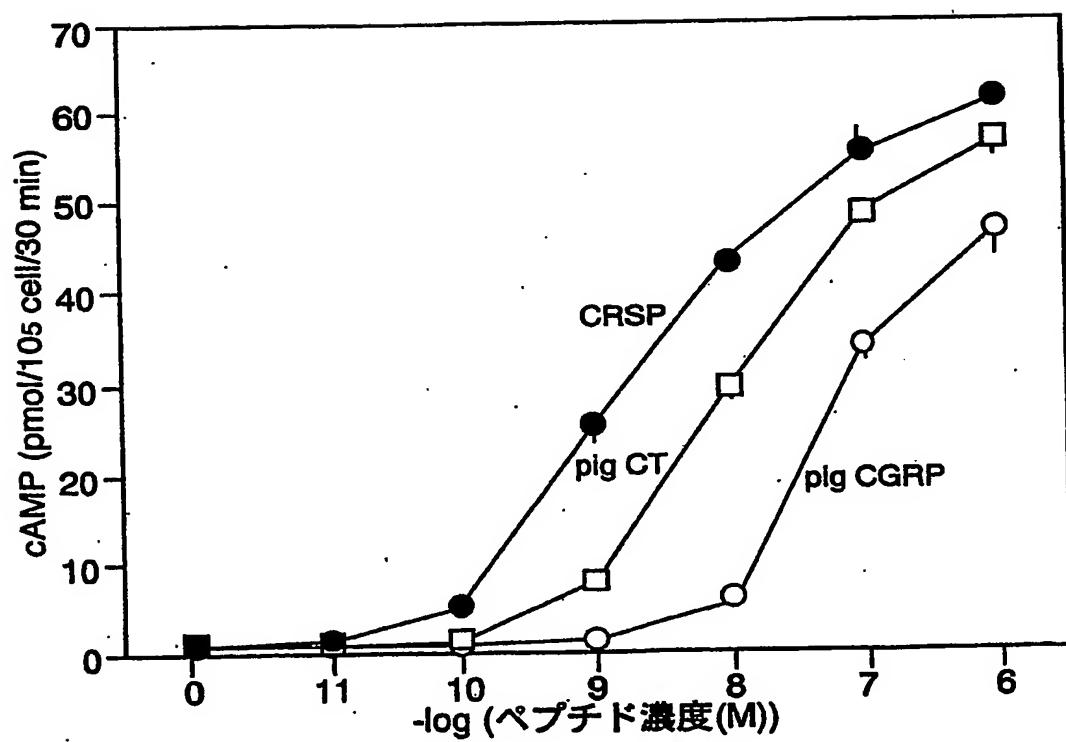
pCRSP
 PCGRP-I
 hCGRP-I
 hCGRP-II
 hAmy1in
 PCT
 hAM

SCNTATOMTHRIVGLLSRSQGSMVRSNTLIPITKMGFKVFG-NH2
 SCNTATCVTHRIAGLLSRSGGIVKSNFVPIDVGSSEAF-NH2
 ACDTATCVTHRIAGLLSRSGGIVKANNEVPITNVGSKRAF-NH2
 ACNTATCVTHRIAGLLSRSGGIVKSNFVPITNVGSKRAF-NH2
 KCNTATCATQRLANEVHSSNNFGATLSSINVGGSNTY-NH2
 CSNLSTCIVL SAYWRNTNNFHRFSGMGFGPEIP-NH2
 YRQSMNNFQGLRSFQQRFQCTVQKIAHQIYQFTDKDKDNVAERSKISPGQY-NH2

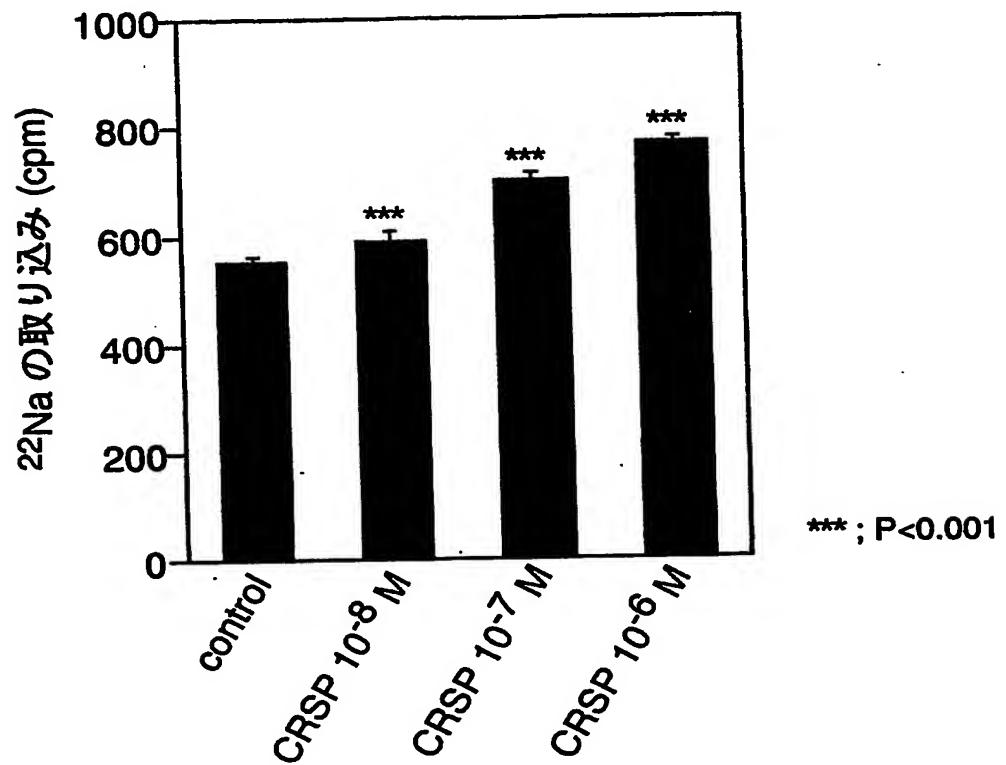
【図3】



【図4】

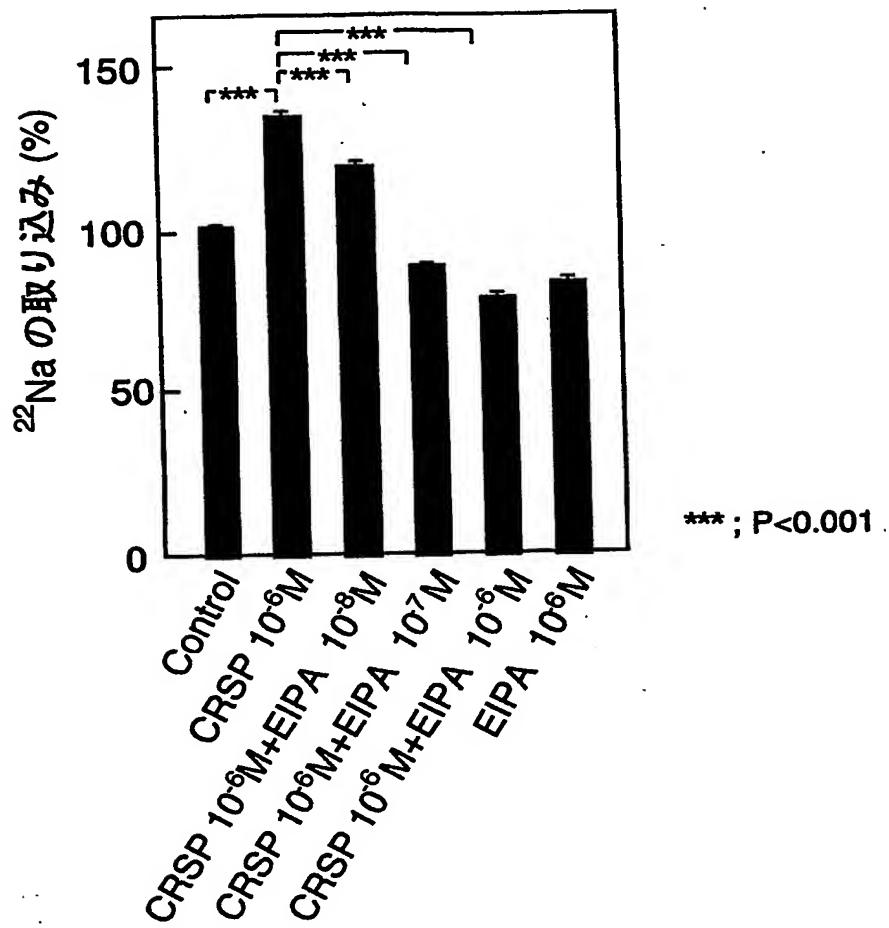


【図5】

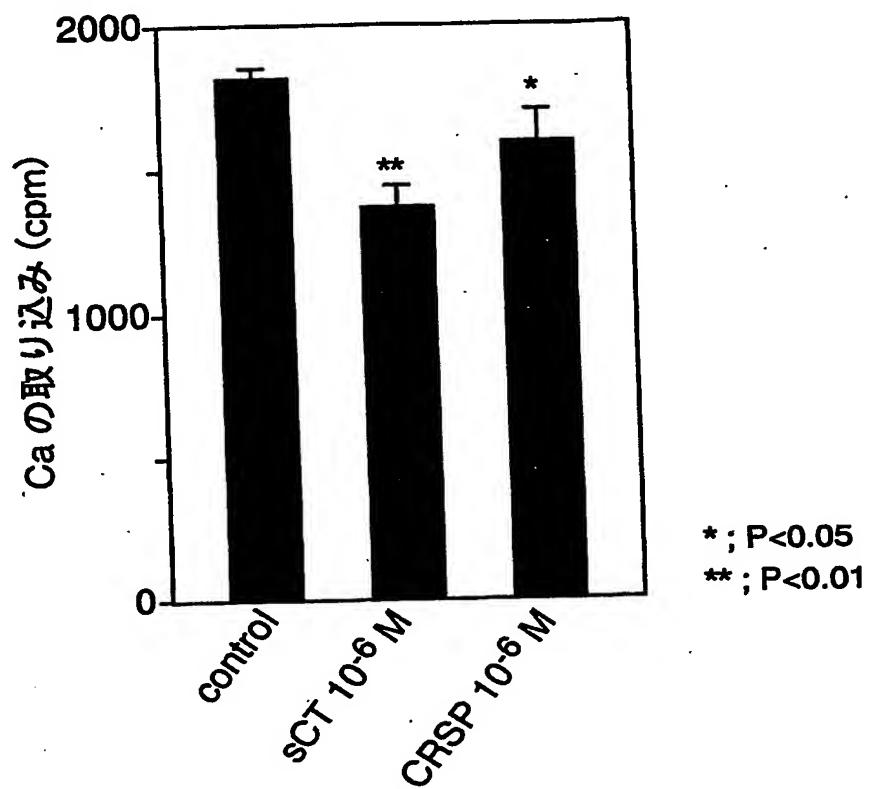
CRSP 刺激による ^{22}Na の取り込みの変化

【図6】

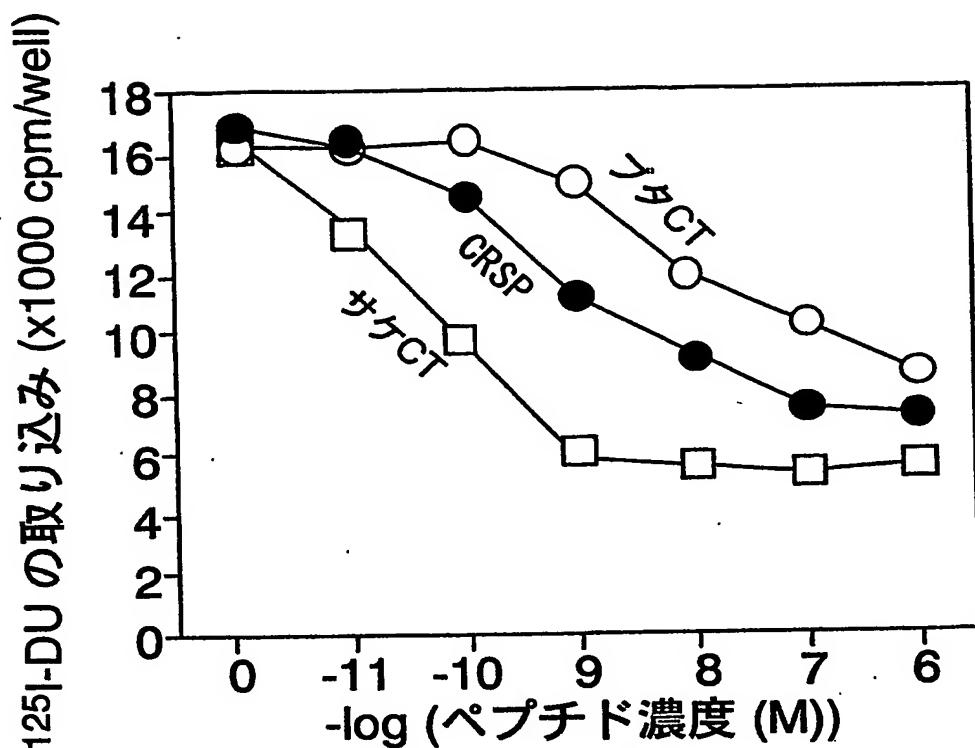
EIPA(アミロライド誘導体)によるNa取り込み上昇の阻害



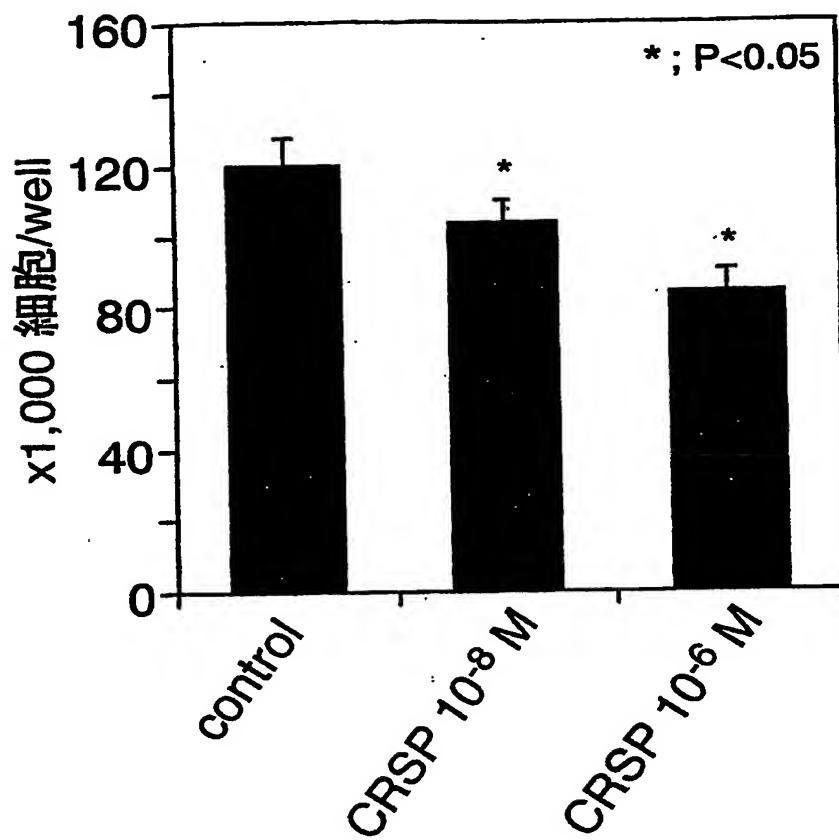
【図7】

CRSP 刺激による⁴⁵Caの取り込みの変化

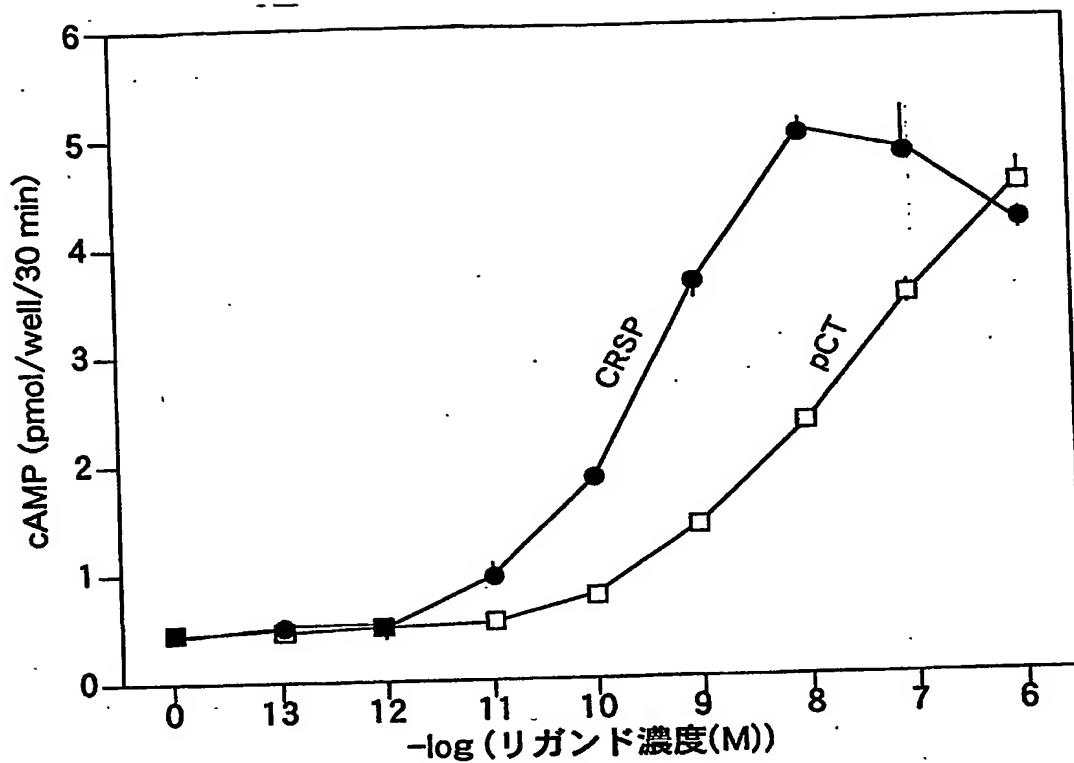
【図8】



【図9】

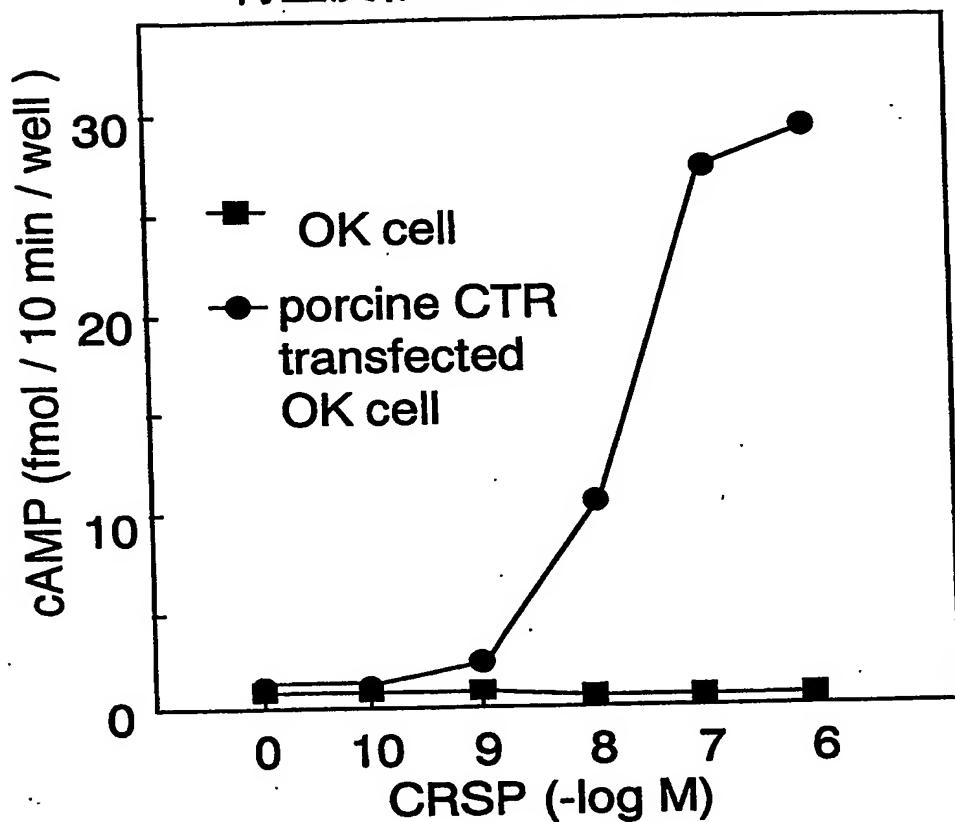


【図10】



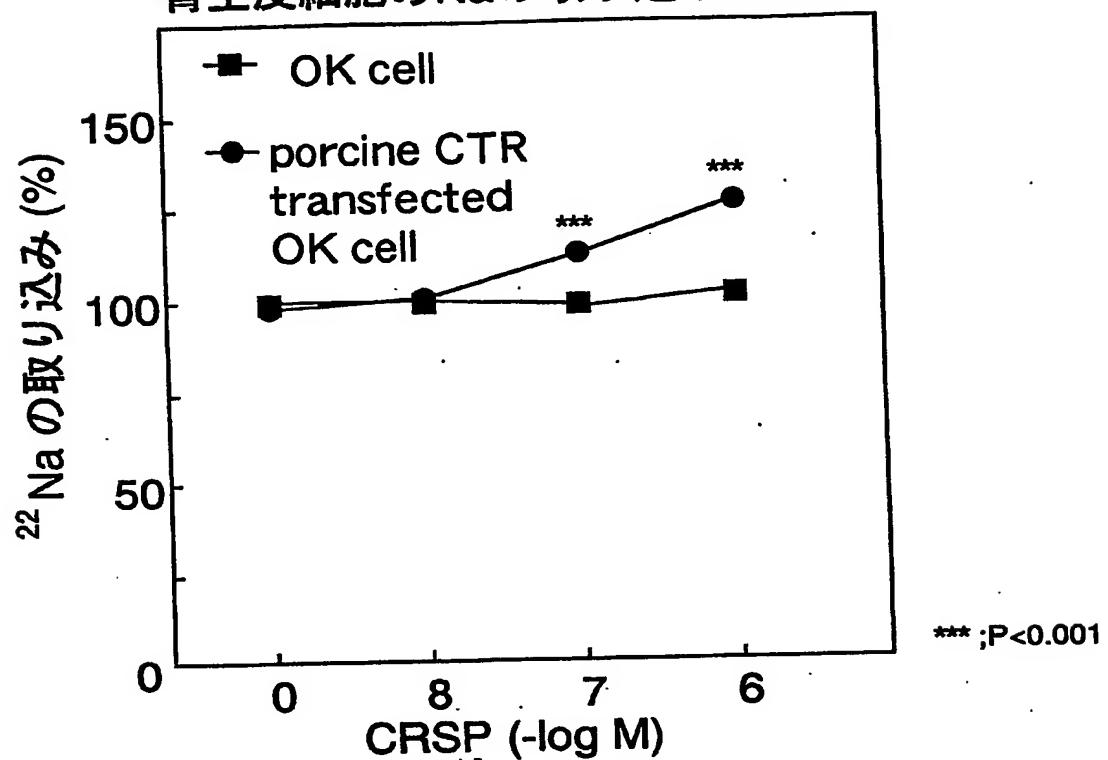
【図11】

ブタCTRを発現させたオポッサム
腎上皮細胞のcAMPの上昇

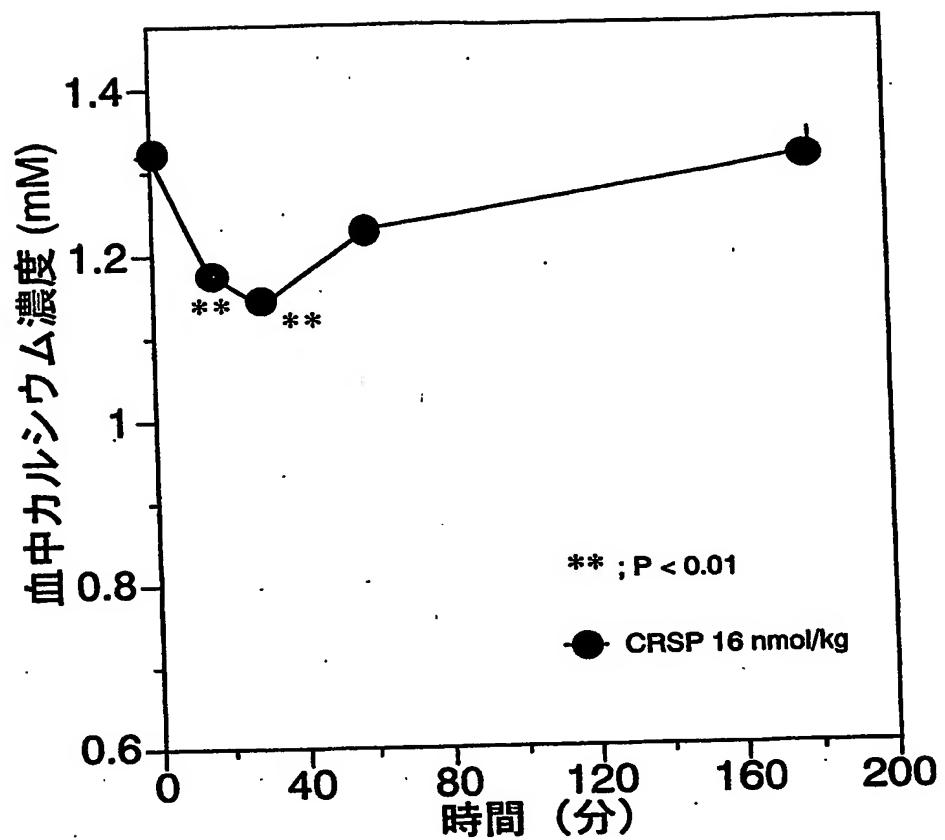


【図12】

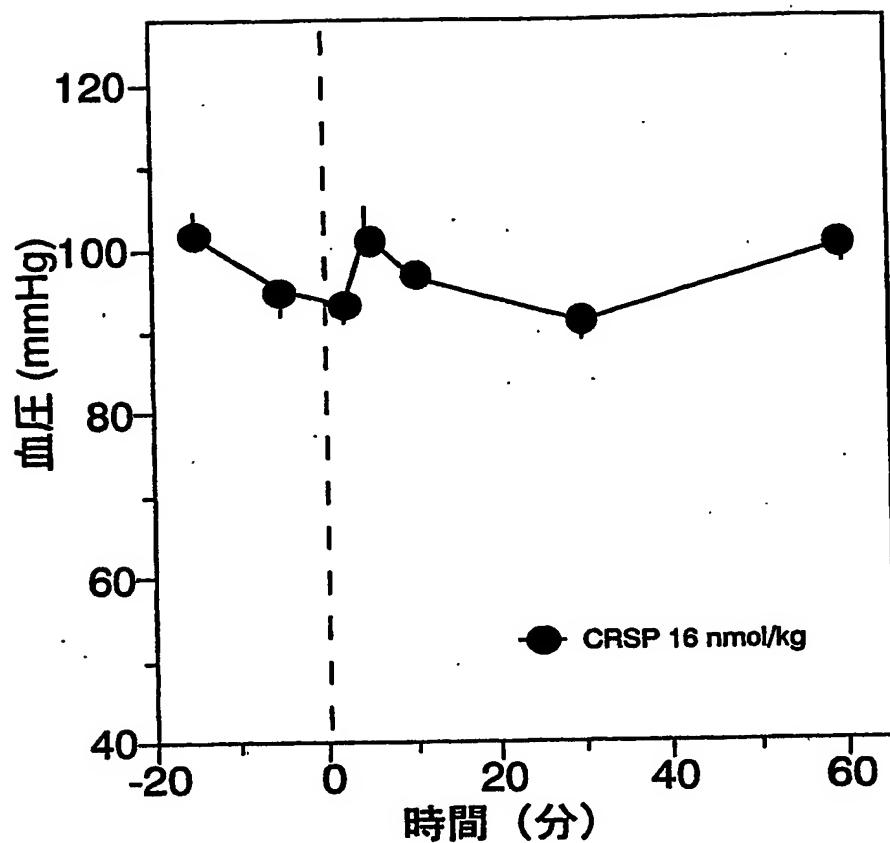
ブタCTRを発現させたオポッサム
腎上皮細胞のNaの取り込みの上昇



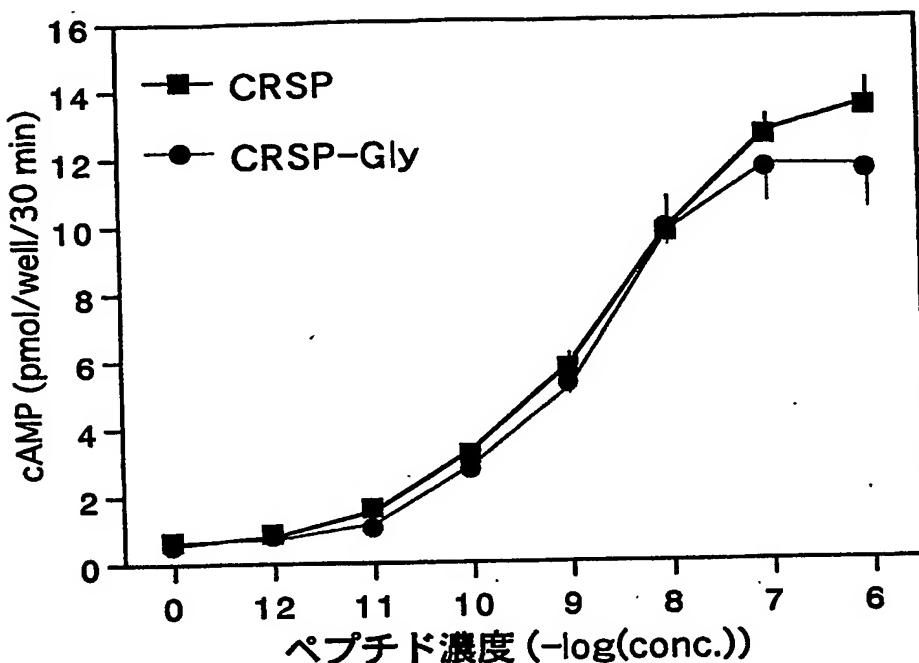
【図13】



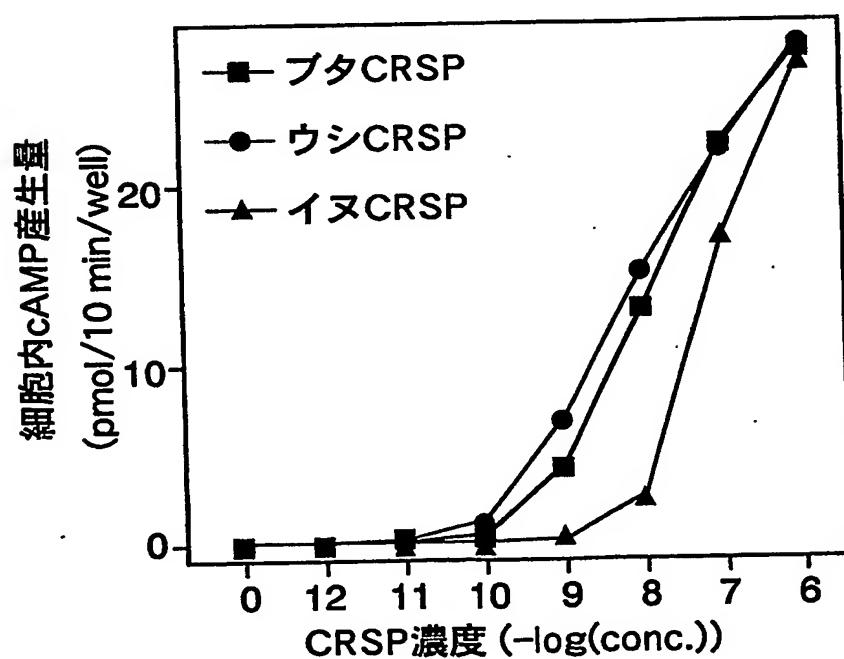
【図14】



【図15】



【図16】



特2002-162797

【図17】

CTCGAGGATCTGCCCTCTGGTTCCCCACAAATCTGCCCTCTGTGCTTGAATCCAGCTG 60
 CCTGAATCAGACCCCCCTGCTGGGACAGAAATCATCACACCTGCTGCCATTAACCTCCCA 120
 AACCGCACTGGACATGGTAGCTTAGGGGACGGGGATGCCCTGTAATGCTGGACTCTG 180
 CTCTACAAAGATCACATAGCTGGGATGAGGGATGTGAGCTGGAAACCGAACAGG 240
 TAAAGTTACCATGACCTCCTAAACTGTCCTTAAATTCCTGCTCACTTTGCGGTGTGTTTC 300
 GTTGGTGGGCCACCAACCTCCACCCCTCCACCCCGCCATCAATGACCTCAATGCAA 360
 ATACAAAGTGGGGTGGTCTGTGTTGGATGCTCCAGGTTCTGGACGCAAGTAGAGACACAATC 420
 CTGGGGCTCAGGATCTTCTCTCTCAATTGGTGTGCTGGAGCTCTGGGACACCCAGATTG 480
 AGAGCGGGAAATAAGACAGCTGGTGTGGGGAGGGTAGAGGGACTACCCACCT 540
 CAAGTGTCTCTGCCGCTCTTCCACAGTGCCTGACGCCAACGCTGCTGCCCTCTG 600
 CTCCTCTCTGCTCAGTCCAGCTGGTTCTGCTGCCCGTAAGGCCGGAGATTCCCTG 660
 TAAGCTGGTTCTCTCCCTCCCTCTCTCCATTGGATTT 720
 CTTAGCTGATCTTCTTCCGCTCAAAGTCTGCTCACTTCCTCTGGGCTCTTCAT 780
 CCTGTAAATGCTTACTGCCCAATTCAATTCTAGGCTCTTCACAGGTAACTCTGGATG 840
 GTCTCAGTTCGGGGATTCCCTGCTACTCTCTCTGAGCTGAGCTGGGCTCCAGTCTTGT 900
 CCCCAGCAGACAGCTGCTAGGCTGGTGTGGAGCTCTCAGGCACTTCAGG 960
 GAGAGGAGGATGAGGAGAAATGCTTGTAGCAGAAAGAAACTTTGATGGATCCATCTCTCT 1020
 TACCTACAAGGATGCTGGAAATGGGGTGGGACCTGGGACAGTGCACAAATGGGCTGGCAA 1080
 TAGGTGCAATGACTGAGGGAAAGTAGCTAAACGCAAGGCCCAGTTGAAGGGTCTGG 1140
 GAACTCCCCCTCCGCAACGGCACCCATTAAATCTGGGCTCCAAATTAAAGCTGTAC 1200
 AGCTTGTCTTCTACAGGGTGCTCTTGCAGAGTATGGAGCAGTGGACAGTAAAATTG 1260
 GTTCTCAGTTCTCAGGAAATTCAACTGCAGAGATATGTCCTCCCAACTCCCCCTTCCC 1320
 CCAGCAGGATAAAGGAGGATGGCAGCATCAGGAGAGATGCTGATGGGTTGCACTATGGG 1380
 AAAAGCTGTGGTGACAGGTAETGGAGTCTGCTCCAGGAGTCCGGGCAACAGGTTGA 1440
 AGGTGAGAGTGTGGGTGTGCTGAGGGGGCTATGGACGGCTCACTGGATCTTCCACCGAGT 1500
 TCCGTCTAGGCTTCTTGTCAAACCAACATGCTGAGGCTCACTGGATCTTCCACCGAGT 1560
 CCACTGGCTGAGGAGAAATGATGGTGTGAAAGGAAAGGACACGAGCAGCTGAAGCCAGG 1620
 AAGCCAGGGAGTGGAGGCAGGGCAGGAGCAGAGCCCAGGTCTGGGCTCAATGAACT 1680
 TGGAACTGCTACAGGTGGTGAACATTGTTCTCCCTGAGAGGGCACATGGGCTTC 1740
 MetGlyPheTr

GAAATTCCGCCCTCTGGTTCTCAGCATCTGGCCTGTACCAAGGCAGGCATGTTCCA 1800
 pLysPheProProPheLeuValLeuSerIleLeuValLeuTyrGlnAlaGlyMetPheHi

CACAGCACCAATGAGGTAAGACAGCCCTGCCAACAAAGCACACTCACTTGATGAGAATGTA 1860
 sThrAlaProMetAla

ATATAAACGTGTATAAAATTATAAGGTGGCTGTAGAACAAATGGATAGTGCCTT 1920
 GCGCTCCTATAAGTTATCATAAAGCTTTATGTCACAAAGTTGTAATAGACATAAG 1980
 ATATACAGTACTCATGTTGTAATTTATATAACTTATCAACCTCACAGCAGTCCTTT 2040
 TTGTTCTCATCAATTGTTACCTTGTACCTGACACGATATGCTCATATTACCCATAATT 2100
 AGAAATGATTGTATCCAATTGGCAAAACTTTGCTAGTAATTGTTATTAATCTGA 2160
 TATGGGATCTACACATCTCATTTCACTTCACTTCAAAACTGCTCATTAAGCTAAAATT 2220
 TTCCCATCAAACATCAGAAACAGGCAACCTGGCTGTTATCTGGGAGGGGAGGCC 2280
 AGGAGATCAGAACCTGTTTGTAGGCTTGGCTTCCCTCTAGGTCTGCCCTGGGAGGCC 2340
 gSerAlaPheGlySerPr

TTTTGATCCTGCTACCCCTCTGAGGAGGAAATCACGCCCTCTGGCTGCAATGGTGAA 2400
 oPheAspProAlaThrLeuSerGluGluIleSerArgLeuLeuAlaAlaMetValAs

TGACTATGAGCAGATGAAGGCCGTGAGATGCAAGAACGAGGGCACAGGGCTCCGGGTA 2460
 nAspTyrGluGlnMetLysAlaArgGluMetGlnArgAlaGlnGlySerG1

AGGTTCCCTGCCAAGGACAACAGGGCATCCCTTCTGGCTGGGTGCAAGGGCAGGAAGG 2520
 CATAATTAAAGTCACTTGTGAGATGCAAGAACGAGGGCACAGGGCTCCGGGTA 2580
 TGGCATTTCCCTGACGGCTAGGATTCTCTGCTGTGATGACCTTTCTAGCAGAAATAC 2640
 TCAAGGTTCACTGGTCTCTCAAGGCACTGAGTACTTCCATGAGCATTCTGTCGTACAGCAC 2700
 CTGCACTAACCTCTCACTGACGGCCCTTTCTTATCCACAAATCAGCATCAGT 2760
 yIleSer

GTCCAGAAGAGATCCTGCCAACACTGCCACCTGCACTGACCCATGGCTGGCTTGC 2820
 ValGlnLysArgSerCysAsnThrAlaThrCysMetThrHisArgLeuValGlyLeuLeu

AGCAGATCTGGGAGCATGGTGGAGGAGCAACCTGTTGCCACCAAGATGGCTTCAAAGTC 2880
 SerArgSerGlySerMetValArgSerAsnLeuLeuProThrLysMetGlyPheLysVal

TTTGGTGGCGCCGAGGAACCTTGGATCTGAGCAGTGGGATGATTCCAGGAGGAAGGT 2940
 PheGlyGlyArgArgAsnPheTrpIle***

GACTGCCCTTTTGACCTTCGGGGAGGACAGAGGACTGGGTATTCCAGGGGTGCA 3000
 TCCACACCTAACCTCTGAGGCGATGGGGTAAACCTCCACATGCCAACGGTCCCA 3060
 CACCAAGTGTCTGGAGAAGGACTGATAATCCCTATAACTGAAACATTGGCTCTTCTT 3120
 CTGTTCTCCAGTCTCTCTGGGACTGACATCATGCTGGAGGAATATAGACCCCTGT 3180
 TTACTTAAACACTGCTCTGGGTTATTGTTGGGCTCAGCTCTAGCATTTAGAATTG 3240
 AAGGTAAATGACCCCTACCCATTGGAGCATACCTTACAATGTTATGAACTTGAGCATAGA 3300
 CTCGGATTCAAAATACTGTCCTGCTCTCCACTAACTTGACCATAGGCAAGTATGCCCT 3360
 GAGCCCTAGCTTCTGTAATTGAGGCAACAACTGACCATAGGCAAGTATGCCCT 3420
 TTAGTATAACATATGACAAGAGGCTGTTACTAAGAAATTATAACATTCTGTTACTTT 3480
 TCCCTCTAGGTTACTATGACTCTGAACTCTACTTCGTTTATTAACATGAAAGCAACC 3540
 TACTAAAAATAGCATGGAAAGACATCCATGATGCTCTGGAAACTGAAAACACTC 3600
 TTTTCCCTGAAATAAACTAAACTAAATAACATGCAATTAAATGATGCACTGCTCAATG 3660
 CTTGTGCACTTGTGTTATGTTGTTATGATGATGCACTGCTCAATTGAGTTTAA 3720
 TGGTAGCAATCTGGCCCTGTCAGCCAACCTGTTGGGGAGCTGCTAAACCTC 3780
 AGGGTCACATGAATT 3796

特2002-162797

【図18】

GGATCCACTAGTTCTAGATAAAATGGACAAATACCTAGAAACAGAACCTACCAAGATG	60
GAAGGATGAAGAAATAGAAAATTCAAATACACCTATGACTAGGAAGGAGAATGAAGCATT	120
AATCCAAAATCTTCCAACAAAGAAAAGCCCTGGATACGATGGCCTCATTGGTGAATAGTA	180
CCAGACATTAAAGAAAACGAATACCAATCCTTGTCAAACCTTTCCAAAACCTGAAGAG	240
AAAGGACACACCCCTAACCTATTCTATGAGGCAGGCAACATTACTCTGATACCAAAGATG	300
GAGAAAAGATTCTGCAAGGAGAAAACCCCTACAGACAAAATCCCTTATGACATGGATGTGG	360
AAACCCCTAACAGTATGCTAGGAATTGAATTCAAAGCGTATTAAAAGGATCCTACAAAC	420
ATGACCAAGTGGGATGAAATTCTGGAATGCAAGGATGATCAAAATATGAAAATTGATCA	480
AAGTGTATATCACAATAATGGAATTGAGGAAAAACACACCTGATTATTCACACTGATA	540
CAGAAAATTATTAGTAAATTCAATACCTTTCAAGGATTAACAAAACACTAGGTATA	600
GAAGGAGACTGCCCTCAGCACAAATACAACTATATGAAAACCAACACCAACCCATAAT	660
CCAGGGTGGAAAAGCTGAAAGCTTCTCCCTAACATGTTAGCTGGAGAAAATGAAAAATT	720
TAAGAATTTCAGACAGATTGGGCTCTGGTACACTCTGAGAAATCATCTTTAGAATT	780
TTTTTTTTTAAAGAACAGAACATTCAATTAAAGAAGGGAAAATAACATAGCCTT	840
CAGAGTTTATCAGGAGGTGTAATTTTTCCACACTAGATTGTGGCTACCTGATGCTA	900
ATTGGAGGTTAAACATAATGAAATAAGATTGTACAGCCAAGTGCAGCTAGTCATGGA	960
ACTTTACCTCAGTACTGTTAGTGTCTCAGTCCTAACAGGTTTCAGGGAGGGCTGCGTG	1020
CAATACAAGTAATCGGTACTTGTCTGAAGGTCTAAATTTCGAGTGCACCTGGTAAATCAG	1080
GGATGGGCGCAGAGGAGACTGGTCTGTAACCTCAGACTAGTGAACCCCTAGAATTAGAAA	1140
GGGTACTTTGTGCTCCAAGCAAATCCTGTTCTACCTAACATAGGTCCTGCTGCAG	1200
GCTGTAGTTAGAGCCCTCTCATAGCAGGGAGACTGCCCCGGTGAATCTGCCAGAGGAAT	1260
GAATTTCATTCACTTCATTCAACAAACATTGGGCGAGTGCACCTCATGTGCAAACAA	1320
TGGTGTAAAGGATGCTAAAGAAAAGATGTTGTTGTAACATTACCCGAGCTCAGAGCCAG	1380
GACTTCTGGAAAAGTCAGGAGACTGGAGGACTTGAAGGAGGTTCATCTCAGCCCCCTCCCTACTGG	1440
AGAGACTGGCTTTCTTCAAGTAAAGCTAAACTGCTGGAGGCTAAGTTAGCACCC	1500
CTGGGGGAGACCCCTGATTCCCTGCCTCTCATCCCCAGCCCTTGTGTGGGCGCCAAG	1560
ATTCTGAGTGGAGGATGAATGTTGGCTTGAACAGGAAAGGCACAAGTGGCAGGCCAAG	1620
GTAGAATGCTGAGCCTACAAATTAAACATAGTTACAAATTGTCTTCTAAAGGAGTCGTTT	1680
CTTAGCCATAGTCAGGCCACCTTGCATTGATCAAAACTGTGGTTCTCCAATGAAAAAA	1740
GACATCCCCAGACACACATACTTACAAATGATTCAGAAAGATTGATAGGTGCGGAAATCTC	1800
AGGTTTGGATTTTATTGCAAAAGCGTTTGCCTGAGTTAAACTTTTTTTT	1860
TTTTTTTTTGTATTTTCACTCTAGGGCGGCTTCGGCGCATATGAAAATTCCCAG	1920
GCTAGGGGTCTAATAGGCGCCATGCCACCGGCCTACGCCAGAGCTACTGCAACGCTGGA	1980
TCCGAGCCGATCTGCAACCTACACCACAACTCACGGCAATGCCGGATCGTTAACCACT	2040
GAGCAAGGCCAGGGATCGAACCGCAACCTCATGGTCTACTCAGATTGTTAACCACT	2100
GCGCCACGACGGCCACTCAAACCTACAGACTCTTAAGTAGCAGAGTCCAATTAC	2160
ATGCCGCACACATCTGTTACCCGAGTTAGCGAACATTGGCTTGGACTAACTCCTCAC	2220
GGAAAGGCCAAGCCGAGTACTCATAAATTATAGTGTGAACCCCCAACCTGGTCTGGCCT	2280
GTGCACCCAATTTCGTTGAGTAGAAACAGGATTACGGAGCCGAGCTCCGCA	2340
TCCTGAACCTCTCTCCTACCTGCCTCATCCTGGAGTGCACCTGCCCTATGAA	2400
CCAGTTTCCGTTCCCTGGTCTCCGATCCGTTGTCTATCTGAGGAGAGCAGATGC	2460
AAGCACCCGATTCCCTAGCCCCAATATTATTCTCTTGTGAAGGAGAAAAGTTGAATAA	2520
GGGTATCTGTAATGAGATGTTCCGAGTCCAGAGAGCACAAACCGGCAAGGGGAACAGA	2580
TGTGCCGAGGCAGGTGTGGAAAAGATATAGAGAAGGCTCAGGTTGGACCTGTGGCT	2640
CAGGTACACTCATGGCAGAGTTGGTTAATTCTGCTCTGCCTGGGGGACACCCTAA	2700
CTGGGGTCTTGTGCTGCCCTCCACGGCCCCGATGCTGTTGCAGCGTTGCGCGCTGGA	2760
GGGTCTGTACAGGCTGCTGGTTATCGCTGTCAGACACAGGTGATCTGAGCAG	2820
CATCCGAACCTGGATTGGGGTAGATGTTGGGACAGGGCTGGAATCACAGGTCACTGGAACA	2880
TCTTGGCAAACAGCAGCCGAAGCGAACAGGGCTGGCAAATGGTTCTGGGACATTGAT	2940
GGGCTTAGATGATGAATGGTGGGGCTGGAGGTGCGCTTGGCGGCTTGGGAAGCATCTATG	3000
CCGGCAGCTCCCTGCCAACCCCCAGTAGGGCACCATCTTCCCCATATGGTGGACCGAC	3060
CACCCAGCGCAGTCCAGACATCCGCACAGAGGTGGGATTGGGAAATGGATCGCGATC	3120
GCACAGAACCCCTCTGCACTTCCCTGGTAAGCTCTCTGATCCCTCCCTGGGTGGAGA	3180
GCAGGTACATGGCTACTAATGATACCAACTCTTGAAGACGGGAATATGATGCCCGTTCC	3240
AAAAATTAAATATAATTGAGGTGCTAGAAGACACTAGCCCGATGATCTTACCTAGAAAA	3300
GGCACAGCTGGAACAAAGTTCCGTGTGACAAAGACTGTGATCCCTGCCCTTGTGTTCCA	3360
CAAATCCTGCCCTCTGTGCTGATTCCAGCTGCCCTGAATCAGACCCCCCTGTTGGGCAC	3420
AGAATCATCAACCTGCTGCGCATTAACTCCCAAACCGCACTTGGACATGGTAGTCTTAG	3480
GGGACCGGGGATGCCTTGTAACGCTGGACTCTGCTCTACAAAGATCACATAGCTGGGAT	3540
GGAGAGGGATGTGAGCCTGCGAAACCGAACAGGTAAGATTACCATGACGTCAAACGTG	3600
CTTAAATTCTGCTCACTTGCGTGTGTTTCGTTGGTGCCTGGACATGGTAGTCTTAG	3660
CTCCCAACCCCGCCATCAATGACCTCAATGCAAGTGGGGTGGCTCTGTTGGATG	3720
CTCCAGGTCTGGACGCCAGTACTAGTGAACACATCTGGGGCTCAGGATCTTCCCTCATT	3780
GGTTGCCCTGGAGCTCTGGGACCAACCCCCAGATTGAGCGGGAGATAAGAGCAGCTGCT	3840

特2002-162797

【図19】

GGTGCGGGGAAAGGGTTAGAGGCACTACCCACCTCAAGTGTCTCTGCGCCTCTTCCACAG	3900
TGCCATCGCCGTACGCCAACGCTGCGCTCGCTCCCTCTGCTCCAGTCCACCTGG	3960
TTCTCTGGCCCGGTAAGCCCGGAGATTCTCTGTAAGCTGGTTCTGTTCTCTCTCC	4020
TCTCTCCCTTCCCTCTCTCTCCATTGGATTCTCTTAGCTGATCTCTTCCCGTCTCAA	4080
AGTCTCTGTCACACTCTCTGGGCTCTTCATCTGTAATATGCCATTACTGCGCAATTG	4140
ATTCTAGGCTCCCTTCACAGGTAACAGCTGGGATGGCTCAGTCTGGGATTCCTGCTCTA	4200
CTCTCTGAGCTGGGCTCCAGTCTGCCCCGACAGACGCTGCTTAGGTCCG	4260
GTTGGGATTGGAGCTCTCCAGGCACTTCAGGGAGAGGAGGATGCAAGGATAGCTTGA	4320
GCAGAAGAAAATTCATGGATCCCATCTCTCTTACAGGATGCCGGAAATGGGG	4380
TCGGGACTGGGACATGGGAAATGGGGTACAGGCTGCAATTAGCTGCAATGACTGAGGGAAAGTAG	4440
CTATTAACGCAAGGGCCAGTGAAGCTCTGGGAACCTCCCGACCGCCACCCC	4500
ATTTAATCTGGGCTCCAATTAAAGGCTGACCGGCTGTTCTTACAGGGTGCCTTTG	4560
CCAGAGATGGAGCAGCTGGGAGCAACTTGGGCTTCAGTCTCAGGGATTCCAAC	4620
TGAGAGATATGTCCTCCAACTCCCTTCCCGCAGGAGATAAGGAAATCAGGC	4680
ATCAGGAGAGATGTCATGGGTTGCACTATGGAAAAGCTGTTGACAGGTTACTGTGAG	4740
TCTGTCCTCAGGAGTCCGGGAAACAGGTTGAGGTCAGGTTGTTGCTGGGAG	4800
GGGGCATGGGAGGAGCTCTCACCAGGTTGCTTGTGCTTGTGCTTGTGCTTGTG	4860
GCATGTCAGGCTCACTGGGATCTTCCAGCTGCACTTGGCTGAGGGAGAAATGATGGT	4920
GAAAGGAAAGGACACGAGCAGGCTGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	4980
GAGCAGAGCCCAGGCTGAGGCTCAATGGGACTTGGGACTACAGGGTGTGACATTGT	5040
TCTTCCCTTGCAGAGGGGACCATGGGCTTGGGAAATTCCGCCCTTCTGTTCTCAG	5100
MetGlyPheTrpLysPheProProPheLeuValLeuSe	
<u>CATCCCTGGTCTGTACCAAGGCAGGCATGTTCCACACAGCACCCGTGAGGTAAAGACAGCAC</u>	5160
<u>rrileLeuValLeuTyrGlnAlaGlyMetPheHisThrAlaProValAr</u>	
TGGTGGCAGTGCCTCTCGCTTCCACGGCCCCCGAATCATATAGTTCTGTTATGAGTT	5220
GTGCTGGTGGAGCTGGCTCTGGGCTTCTGTTGTTGATAGGGGCTGGGGCTCTAAT	5280
GTATGAATATAGTCATGTTATATAAGTTTATTAAATATTGTTGATCCAAGATAATATC	5340
ACAAAGTTTACAATAAAATAGAAGATATACTAAGTATTCTACTATAAAACTCACTG	5400
AACATACAGCATGTTTGTGTTTGTGTTTATGAAATGTTTATAACTTTAGCAAACTATA	5460
TAGTAATTAGCCATTATGAGCAATGAAATTGCAATTCTAATTAACTGAAATTGTCATAATAA	5520
ATTTGTTTAAATCTGAAAGGTAATCTATACAATTCTCACCCCTTCTCAAATTATATT	5580
ATATGAAACCATTTCTATTTAACTATCTTAAATTAAATGGCTGTATTAA	5640
CACTAGCTCATGAGATCTAACCATCAGCTTCTCAAAGCCTACATGATGTC	5700
ACTTCAGCAGAACTACTTTGAGGACACCCAGGCTAACATCATGGTGAAGCAGCATTT	5760
TTGGATGAAACACTAGCCTTATGTCCTGACCGGTTGAGAATTCTACAGCCTTATTCTCAGA	5820
GGAAAGTGGCAGAACCCAGGAAATCTGGCTGCTTATCTAGGGCTGTGTTAGGCTCAGC	5880
GCATGTTGGGCTGCTTCCCTCCAGATTGCTTCTGGAGAGCAGCTTGATTCTGCCA	5940
gLeuProLeuGluSerSerPheAspSerAlaT	
<u>CTCTCACAGAGGGAGGAAAGTGTCCCTCTACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGAGA</u>	6000
<u>hrLeuThrGluGluValSerLeuLeuLeuValAlaMetValLysAspTyrValGlnM</u>	
TGAAGGCCACTGTGCTGGAGCAGGGAGTCAGAGGACTTCAGGTCAGTCCTTGCACCCCTCC	6060
<u>etLysAlaThrValLeuGluGlnGluSerGluAspPheSe</u>	
CAGAAATATGGCTTACCCCTCCTAGACTACAGGAAGGCATATCTTAAAGAATGAGAAATT	6120
TGTTATAGTGCCTACGGCTTGTGATGTCAGCTCTATAAGCCTGGTTTATTTAGTTA	6180
TTACACAGGAGAGATTGTCTATTACAGTTGCTATTCCAGGCTCAGTAAATGAGCAGCCAC	6240
CTTTGGGTTTCTGACACCCCTGAAATGTCATGGGAGGTGATGTCATTTCCCAA	6300
AGCCCTATGGTTTCTGTTGTTGTTGTTAGCAGAAACATTCTAGGTTCACTGGTC	6360
CCTCTCAGGCTGTAATTCTCACTGATGGTCACTGGCTGGGGGAATCACTTGCCTCTCAA	6420
GCTGTCATTGGCAGGCCCTCTCTTGTCTCCATCCTGAAATCAGCATCACTGCCAGGA	6480
rrileThrAlaGlnG	
<u>GAAATCCTGCAACACTGCTAGCTGTGACCCACAAGATGACAGGCTGGCTGAGCAGATC</u>	6540
<u>uLysSerCysAsnThrAlaSerCysValThrHisLysMetThrGlyTrpLeuSerArgSe</u>	
TGGGAGCGTGGCTAAGAACACTTCATGCCACCAATGGGACTCCAAAATCTGGGCTG	6600
rglySerValAlaLysAsnAsnPheMetProThrAsnValAspSerLysIleLeuGly**	
ACGCCGCAGAGAGCCTCAGGCCCTGAGCTGTGAAATGACTCCACAAAGAAGGTGACTGTC	6660
*	
TAGAACATGGGATAGCAGGGCAAATGGCTGGGTATTCAGGGGTGTTGGCTACACTCTAA	6720
CCCTCCCTGAGCTGACTGTTGGGAAATCTTAACTTAACTGAAAGTTGCTGACCCCTTATATCC	6780
TCAGAAAGAAAAGAGAACTCTAATAGCCAAAACCCCTTATAACTTACGCTCATTCTTATTT	6840
TTTTCAGTGTCTCCAGTGCAGCTGAGGTCATCTGTCAGGAAACATAGATTCTTATTCTT	6900
TTTTCCTTTCTTTGGCTACACCCAGGCTGAAAGTTGGGCTGAGGGATTGAAAT	6960
CTGAAACCATGCTGACCTATGCGACTACCTGCTGGCAACACTGGGATCTTAAACCAAATGT	7020
ACCCACATCAGGAACTCTTAGGCTCTATTATTTAAACACTGTTCCCTGCACTTATAATTG	7080
TGATTATTCTAGTTGGAGTTGAAAGGTAATGACTTATCCAGTGAGTTGAAAGTATA	7140
ACTACAATGTCACATATATCTGAAATTGAGCTTGGTTTCAATTGCGATGTC	7200
TCTTCACTAATCTACAAACCATGGCCAGACCCCTCTGAAACCTCAGTTCTACATGAAA	7260
CTTTAGGCAACAAATAATTACCTGTTATCATTAAATATAAAAGTAACCTGAGATAATT	7320
CATGTTAGGCAACAAATAATTACCTGTTATCATTAAATATAAAAGTAACCTGAGCTTATTTCTCC	7380
TAGGTCACCAAGGAACTGAACTCTATTCTTAACTGCAATGAAAGCAATTAAATTGTA	7440
AAAATAGCATGGAAAACACACATATATGCACTGCTCTGCTTGAATACAGCTTTAGCT	7500
TGAATAAAACTAAACTAAATGCAAGATAAAATCATTGCACTACCTGAAATGTTATCATT	7560
TTAATTTGATTCTGTTATCTATAAGTATGACTCATGTCCTCGCTGGCTTATCAGGTTAGC	7620
AAATCTGGACCCCTGTCAGGCCAACCTGTTGGTGGCAGCTGCTAAACCTC	7673

【図20】

CTCAAGTGTCTGCCGCTTCCTCACAGTGCCATGCCCTGACGCCAACGCTGCTGCCCTC	-52
TGCTCCCTCCTCTGCTCCAGTCCACCTGGCTCCTGCTGCCCGAGGGGACCATGGGCTTC	9
	M G F 3
TGGAAATTTCGGCCCTTCCTGGTTCTCAGCATCCTGGCTGTACCAAGGCAGGCATGTTC	69
W K F P P F L V L S I L V L Y Q A G M F	23
CACACAGCACCCGTGAGATTGCCCTGGAGAGCAGCTTGATTCTGCCACTCTCACAGAG	129
H T A P V R L P L E S S F D S A T L T E	43
GAGGAAGTGTCCCCTACTGGTGCATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E V S L L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
<u>GTGCTGGAGCAGGAGTCAGAGGACTTCAGCATCACTGCCAGGAGAAATCCTGCAACACT</u>	249
<u>V L E Q E S E D F S I T A Q E K S C N T</u>	83
<u>GCTAGCTGTGACCCACAAGATGACAGGCCTGGCTGAGCAGATCTGGGAGCGTGGCTAAG</u>	309
<u>A S C V T H K M T G W L S R S G S V A K</u>	103
<u>AACAACCTCATGCCCACCAATGTGGACTCCAAAATCTGGGCTGACGCCAGAGAGCCT</u>	369
<u>N N F M P T N V D S K I L</u>	117
CAGGCCCTGAGCTGTGAAATGACTCCACAAAGAAGGTACCAAGGAACCTGAACCTTATTC	429
TTTTAATCTGCAATGAAAGCAATTATTTGAAAAATAGCATGGAAAACACACATATATGC	489
ATGCTTCTGCTTGAAATACAGCTTGTGAAATAACTAAACTAAATGCAGAATA	549
AAATCATTGCAGCTACCTGAAAAA	579

【図21】

GCCCAGCTTACGTCTCCCTTCCTCCGCCAGTGCATCACCTGCCACCAGCGGGTGTGC	-52
TTCTCCCACTTGGCTCCAAGCTACCTGGTCCATCCAGAGGGGACCATGGCTTC	9
M G F	3
TGGAAGTTCCCCCCCCCTTCCCTGATCCTCAGGCATCCTGGTCTGTACCAAGCAGGAATGCTC	69
W K F P P F L I L S I L V L Y Q A G M L	23
CATGCCGCGCCATTCAAGGATGGCTTGGGAAGCAGCTTGATTCTGCCACACTCACGGAA	129
H A A P F R M A L G S S F D S A T L T E	43
GAGGAAATGTCCCTCCTACTGGTIGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E M S L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGACAGAGGACTTCAGCATCACCAACCAGGAGAGATCCTGCAACACT	249
V L E Q E T E D F S I T T Q E R S C N T	83
GCCATCTGTGTGACCCACAAGATGGCAGGCTGGCTGAGCAGATCTGGGAGCGTGGTTAAG	309
A T C V T H K M A G W L S R S G S V V K	103
AACAACCTCATGCCCATCAACATGGGCTCCAAAGTCCTGGGCCGGCGCCAGACAGCCT	369
N N F M P I N M G S K V L R R R R Q P	123
CAGGCCCTGAGCTGTGAAATGACTCTAAAAAGAAGITGAACCTCAAGTTGCCTTCACTGCAA	429
Q A *	125
AGTTGCTTCCCTGCAAATTAAAAGAACCAATTGAAAAATAGCATGGAAGACACACATA	489
TATGCATGCTCTTGCTGAAATACAACCTTTGCTGAAACAAACTAAACCTAAATGCA	549
GAATAAAATCATTGCAGTTACCTGA	574

【図22】

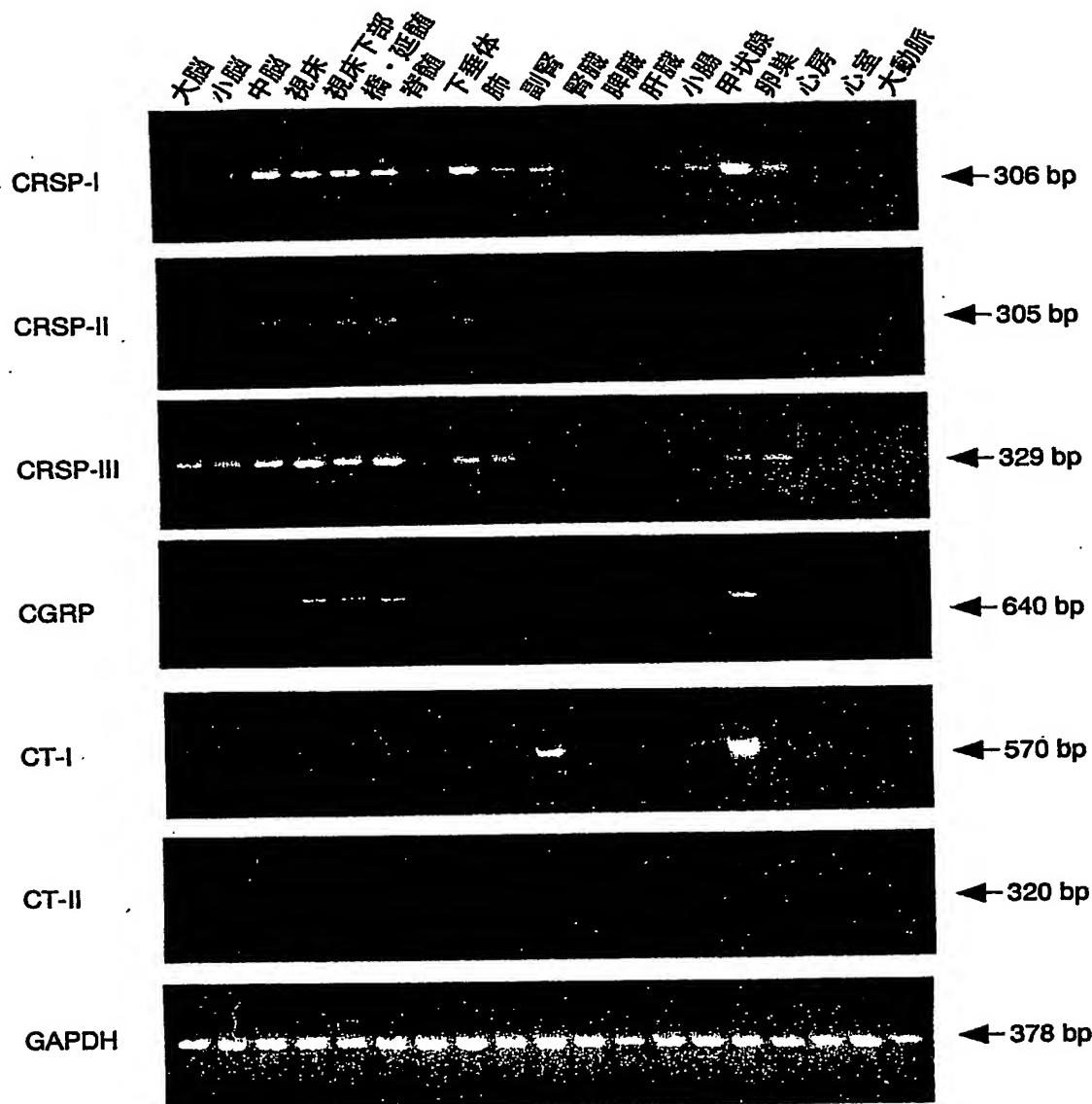
GCCCAGCTTACGTCTCCCTCTCCGCCAGTGCACCATCACCTGCCACCAGCGCGGTTGTC	-52
TTCTCCCCACTGGGCTCCAAGCTACCTGGTCCATCCAGAGGGGACCATGGGCTTC	9
M G F	3
TGGAAGTTCCCCCCCCCTTCCCTGATCCCTCAGCATCCTGGTCTGTACCAAGCAGGAATGCTC	69
W K F P P F L I L S I L V L Y Q A G M L	23
CATGCCGCCATTCAAGGATGGCTTGGGAAGCAGCTTGATTGCCACACTCACGGAA	129
H A A P F R M A L G S S F D S A T L T E	43
GAGGAAATGTCCCTCCACTGGTTGCAATGGTGAAGGATTATGTGCAGATGAAGGCCACT	189
E E M S L L L V A M V K D Y V Q M K A T	63
GTGCTGGAGCAGGAGACAGAGGACTTCAGCTGGACAGCTCCAGAGCTAACAGTGAAT	249
V L E Q E T E D F S L D S S R A K Q C N	83
AATCTGAGTACCTGTGTGGAACATATACATGGGACGTCAACAAGTTTATGCATT	309
N L S T C V L G T Y T W D V N K F Y A F	103
CCCTTAACAACTGGGATTAGAGTATCTGCAAGAAATGGTCAGGGCCAGAGCTCA	369
P L T T T G I R V S K K W V R A R V S	123
GAGAAAGTCCATTATCCCTCAAGGCAGCATACCTAACGGTGCCTAACAGAAGGCCACCC	429
E K V H Y P S R Q H T L R C L R R P P P	143
CTCCTCCCTCTAGTTCTCTCTAGAATTGCATGTGTTCTCTCTGGTTGCTCTGA	489
L L L S S S S P R I C M C S S L V A L	162
GCTGCTATCAGCAGCTTCCCTGGCATGGATGTCAGGAATATCAGAGAGGAGGTGGG	549
GGGTGGGGCAGGCAGGCCAGAAGAAAATCACTCAGGAATAGATTAGGAGAGAATGGGCA	609
GCCCTGTGAGTGCCTGTGGATTTCACAGCAGAGCTTCAGTCCTGCTCTGAACATGCT	669
TTTCACTAGGAAATAAAAGTAT	691

〔図23〕

SCNTASCVTHKMTGWLSRSGSVIAKNNFMP-TNVD~~SKVII~~-NH₂
 SCNTAI~~CVTHKMA~~GWL~~SRSGSV~~KNNFMP-~~INMGSKVII~~-NH₂
 SCNTAI~~CMTHR~~LVG~~TL~~SRSGSMVR~~SN~~LLP-TKMG~~GF~~KVFG-NH₂
 SCNTAI~~CVTHR~~LAG~~LL~~SRSGGMWSN~~EV~~VP-TDVGSEAF-NH₂
 YRQSMNNFQGLRSF~~G~~CRFGTCTVQKLAHQIYQFTDKDKDGVA~~PRSKIS~~PQGY-NH₂
 pCRSP-2
 pCRSP-3
 pCRSP
 pCGRP
 pAM

CSNL~~ST~~CVL~~SAY~~TRNL~~NN~~HRESGMGF~~CPETP~~-NH₂
 pECNNL~~ST~~CVL~~GTY~~TWDVNKF~~YAF~~PLTTGIRVS-NH₂
 pCT
 pCT-2

【図24】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、中枢神経系に発現し、カルシトニン受容体に作用する新規かつ有用な蛋白質、その遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物を提供する。

【解決手段】 本発明は、次の(1)～(6)の性質、(1) 中枢神経系において発現し、(2) カルシトニン受容体に強く作用し、(3) 細胞のcAMP産生能を促進させ、(4) ナトリウムイオンを濃度依存的に取り込む作用を有し、(5) カルシウムイオンの取り込みを抑制し、(6) 細胞増殖を抑制する作用を有するペプチドに関する。より具体的には、配列表の配列番号1、配列番号2、配列番号6、配列番号9、配列番号12、配列番号16、若しくは配列番号19で示されるアミノ酸配列、又はこれらのアミノ酸配列の一部が欠失、置換若しくは付加を受けたアミノ酸配列を有する前記のペプチドに関する。また、本発明は、これらのペプチドをコードする遺伝子、及びそれを含有してなる医薬組成物に関する。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

出願人履歴情報

識別番号 [591108880]

1. 変更年月日 1991年 5月24日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府吹田市藤白台5丁目7番1号

氏 名 国立循環器病センター総長

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.